

10527191

AD



世界知的所有権機関  
国際事務局

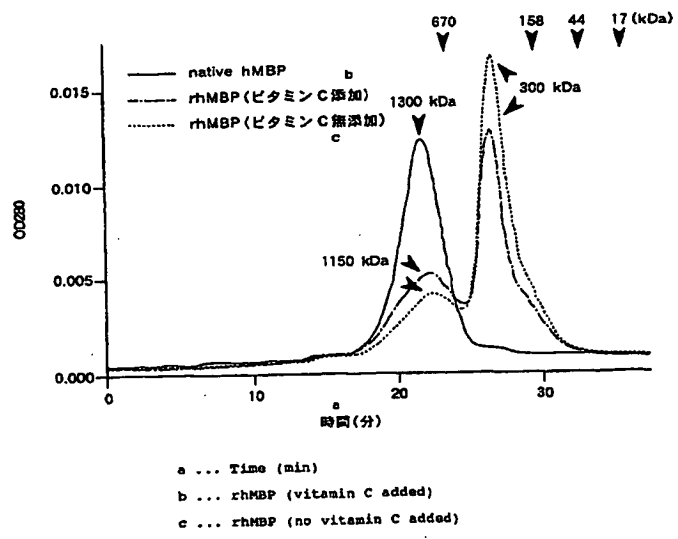
PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類6 <b>C07K 14/47, C12N 15/12, C12P 21/02 // A61K 39/00, 37/02, (C12P 21/02, C12R 1:91)</b>		A1	(11) 国際公開番号 <b>WO99/37676</b>
			(43) 国際公開日 1999年7月29日(29.07.99)
(21) 国際出願番号 <b>PCT/JP98/03311</b>		(81) 指定国 <b>CA, US</b>	
(22) 国際出願日 1998年7月23日(23.07.98)		添付公開書類 国際調査報告書	
(30) 優先権データ 特願平10/11864 1998年1月23日(23.01.98)		JP	
(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 扶桑薬品工業株式会社 (FUSO PHARMACEUTICAL INDUSTRIES, LTD.)[JP/JP] 〒541-0045 大阪府大阪市中央区道修町1丁目7番10号 Osaka, (JP)			
(72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 若宮伸隆(WAKAMIYA, Nobutaka)[JP/JP] 〒567-0826 大阪府茨木市大池1丁目9-20 Osaka, (JP)			
(74) 代理人 弁理士 角田嘉宏, 外(SUMIDA, Yoshihiro et al.) 〒650-0031 兵庫県神戸市中央区東町123番地の1 貿易ビル3階 Hyogo, (JP)			

(54)Title: RECOMBINANT HUMAN MANNAN-BINDING PROTEINS AND PROCESS FOR PRODUCING THE SAME

(54)発明の名称 組換えヒトマンナン結合タンパク質およびその製造方法



(57) Abstract

A production system for homogeneously producing recombinant human mannan-binding proteins (rhMBPs) being comparable in physiological activity to human mannan-binding protein (hMBP), in particular those showing a specific peak at molecular weight of from 1,000 to 1,300 kDa in the absorbance (280 nm) in gel filtration chromatography.

(57)要約

ヒトマンナン結合タンパク質(hMBP)と同質の生理活性を有する組換えヒトマンナン結合タンパク質(rhMBP)、特に、ゲル濾過クロマトグラフィーでの吸光度(280nm)が、1,000~1,300kDaの分子量にて特異的なピークを示すrhMBPを均質に生産する生産系が提供される。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SG	シンガポール
AL	アルバニア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SI	スロヴェニア
AM	アルメニア	FR	フランス	LR	リベリア	SK	スロヴァキア
AT	オーストリア	GA	ガボン	LS	レソト	SL	シエラ・レオネ
AU	オーストラリア	GB	英国	LT	リトアニア	SN	セネガル
AZ	アゼルバイジャン	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	TD	チャード
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BE	ベルギー	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BF	ブルキナ・ファソ	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BG	ブルガリア	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR	トルコ
BJ	ベナン	HR	クロアチア		共和国	TT	トリニダード・トバゴ
BR	ブラジル	HU	ハンガリー	ML	マリ	UA	ウクライナ
BY	ベラルーシ	ID	インドネシア	MN	モンゴル	UG	ウガンダ
CA	カナダ	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	US	米国
CC	中央アフリカ	IL	イスラエル	MW	マラウイ	UZ	ウズベキスタン
CG	コンゴ	IN	インド	MX	メキシコ	VN	ヴェトナム
CH	スイス	IS	アイスランド	NE	ニジェール	YU	ユーゴスラビア
CI	コートジボワール	IT	イタリア	NL	オランダ	ZA	南アフリカ共和国
CM	カメルーン	JP	日本	NO	ノルウェー	ZW	ジンバブエ
CN	中国	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド		
CU	キューバ	KG	キルギスタン	PL	ポーランド		
CY	キプロス	KP	北朝鮮	PT	ポルトガル		
CZ	チェッコ	KR	韓国	RO	ルーマニア		
DE	ドイツ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア		
DK	デンマーク	LC	セントルシア	SD	スーダン		
EE	エストニア			SE	スウェーデン		

## 明 細 書

## 組換えヒトマンナン結合タンパク質およびその製造方法

## 5    [技術分野]

本発明は、抗微生物活性、特に、抗インフルエンザウイルス活性を有する新規の組換えヒトマンナン結合タンパク質(以下、単に「rhMBP」と称する)とその製造方法に関する。

## 10   [技術背景]

マンナン結合タンパク質(以下、単に「MBP」と称する；マンノース結合タンパク質、マンノース結合レクチン(MBL)あるいはマンナン結合レクチン(MBL)とも言う)、コングルチニン、サーファクタントタンパク質A(SP-A)、およびサーファクタン  
15   トタンパク質D(SP-D)などは、いずれもコレクチンと称するグループに属する物質である。

コレクチンは、第1図を参照すれば、(1)カルシウムイオン( $\text{Ca}^{2+}$ )要求性の糖認識領域(CRD)、(2)ネック領域、(3)コラーゲン様領域、および(4)システインを含むN末端領域の4種の  
20   特徴的な領域からなる構造を構成単位としており [Malhortra et al., ヨーロピアン・ジャーナル・オブ・イムノロジー(Eur. J. Immunol.), 22巻、1437-1445頁、1992年]、この構成単位3つ(3単位)が各々のコラーゲン領域で寄り合ってトリプルヘリックスを形成し、そしてサブユニットを構成するのである。

25   また、このサブユニットがさらに3量体、4量体あるいは6量体などのオリゴマー構造を形成するのである。コレクチンの内、MBPは、マンノースやN-アセチルグルコサミンに特異的に結合し、その結合に際してカルシウム(イオン)を要求す

る物質であり、例えば、ヒト血清由来のMBPでは、分子量約32,000のサブユニットを構成単位としたホモポリマーの形態となっている〔藤田禎三、「補体活性化とレクチン経路」、臨床免疫、第29巻、第3号、405-410頁、1997年〕。

- 5 脊椎動物では、細胞を介する免疫応答および特異的抗体反応によるメカニズムが、病原菌の侵入に対する最大の生体防御システムと考えられている。しかしながら、最近になって、これらのレクチンによる非特異的な免疫応答が、母親の移行抗体や特異的防御システムが十分に発達していない小児における、
- 10 種々の微生物やウイルスに対する中和作用や排除に重要な役割を果たしていると考えられている〔Super et al., ランセット (Lancet)、II、1236-1239頁、1989年；若宮伸隆、鈴木定彦、「レクチンによるウイルス感染防御」、臨床免疫、第29巻、第4号、508-513頁、1997年〕。また、宿主の生体防御における
- 15 これらレクチンの役割について、例えば、MBPの遺伝子上の変異に起因したMBPの血中濃度の低下によって、ウイルス感染を受けやすくなるという研究結果が報告されている〔Sumiya et al., ランセット (Lancet)、337巻、1569-1570頁、1991年〕。

- 本発明者は、以前に、コングルチニンやMBPが、H1およびH3
- 20 タイプのインフルエンザAウイルスの感染や赤血球凝集抑制活性を阻害することを報告している〔Wakamiya et al., グリココンジュゲイト・ジャーナル (Glycoconjugate J.)、8巻、235頁、1991年；Wakamiya et al., バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ (Biochem.
- 25 Biophys. Res. Comm.)、187巻、1270-1278頁、1992年〕。

殊に、ヒトMBP(以下、単に「hMBP」と称する)については、近年、その構造的および生理作用(活性)的側面から各方面で熱心に研究が行われている。例えば、Ezekowitz(ら)は、

hMBPの構造について、その立体構造と遺伝子レベルでの解析結果を報告している[Epstein et al., "The collectins in innate immunity", Current Opinion in Immunology, 8巻、29-35頁、1996年；特表平2-504581号]。

- 5 一方で、hMBPの生物学的作用として、これまでに、(i)抗微生物活性、(ii)オプソニン作用、(iii)補体活性化などの基礎免疫を担うものと考えられている[上村和秀、他、「生体防御に関するカルシウム依存性動物レクチンの構造と機能の相関」、実験医学、第13巻、第18号、1995年]。臨床現場での応用について、血中MBPの欠損症についての解析が進んだことで、該欠損症の原因がコラーゲン様構造内の遺伝子の変異がアミノ酸変異を招き、その結果、MBP自体の安定性と血中濃度の低下に至ることも報告されている[Sumiya et al., "Mannose-binding protein, genetic variants and the risk of infection", Q
- 10 J Med., No. 89, pp.723-726(1996); Thomas et al., "Mutation of gene for mannose-binding protein associated with chronic hepatitis B viral infection", The Lancet, Vol.348, pp.1417-1419 (1996); Ezekowitz, "Mannose-binding protein and susceptibility to chronic hepatitis
- 15 B infection", The Lancet, Vol. 348, pp.1396-1397 (1996)]。
- また、血中MBP濃度そのものが、B型肝炎ウイルスやHIV感染時の病態にも関係があるとの報告が出されている。その反面で、MBPが慢性関節リュウマチ[Malhorta et al., "Glycosylation changes of IgG associated with rheumatoid
- 20 arthritis can activate complement via the mannose-binding protein", Nature Medicine, Vol.1, pp.237-243 (1995)]やIgA腎症[松田充浩ら、「IgA腎症の発症、進展への Mannan Binding Proteinの関与」、日本腎臓学会誌、vol.39、

No. 3、235頁、1997年]の疾患において、イムノグロブリンの糖鎖異常によって、MBPを介したレクチン経路が関与している可能性も示唆されている。

さらに、最近の研究によれば、hMBPがHIVに対する感受性の  
5 みならず、AIDS(後天性免疫不全症候群)発症までの潜伏期間  
に関連する旨の報告もあり、hMBPがAIDS患者の延命効果に寄与  
する可能性も出てきている[Garred, et al., "Susceptibility  
to HIV infection and progression of AIDS in relation to  
variant alleles of mannose-binding lectin", The Lancet,  
10 Vol. 349, pp.236-240 (1997)]。

ところが、hMBPは、かような生理活性医薬物質(成分)とし  
ての有用性が期待されている物質でありながら、ヒトやウサギ  
などの生体の血清にその採取源を依存しているために、その安  
定供給が困難であることに加え、自然界から採取できる量はご  
15 くわずかであるのが実情であった。また、遺伝子組換え手法  
によっても人為的に大量に得る体制は未だ確立していない。

#### [発明の開示]

本発明は上述した従来技術での問題点に鑑み、均質なhMBPの  
20 大量供給を実現すべく鋭意研究した末に完成されたものである。

すなわち、本願発明によって得られるhMBP(rhMBP)とは;ゲル濾過クロマトグラフィーで処理した際の280nmでの吸光度が、  
1,000~1,300kDa、好ましくは1,150kDaの分子量にて特異的な  
ピークを示す性状を備えたrhMBP;ゲル濾過クロマトグラフィー  
25 で処理した際の280nmでの吸光度が、200~400kDa、好ましくは  
300kDaの分子量にて特異的なピークを示す性状を備えたrhMBP;  
およびゲル濾過クロマトグラフィーで処理した際の280nmでの  
吸光度が、1,000~1,300kDaおよび200~400kDaの分子量ピーク

を示す性状を備えたrhMBPにある。

- また、本願発明のrhMBPは、以下の工程、すなわち、(1)天然型ヒトマンナン結合タンパク質(以下、単に「native hMBP」と称する)のcDNAの66bp～812bpに対応するcDNA部分をプラスミド
- 5 pNOW1に挿入して、発現ベクターpNOW1-hMBPを構築し、(2)この発現ベクターpNOW1-hMBPを、ジヒドロ葉酸還元酵素欠損(dhfr<sup>-</sup>)のチャイニーズハムスター卵巢(CHO)細胞に導入して形質転換体を得、(3)得られた形質転換体をネオマイシンを含んだ培養培地にて培養して、ネオマイシン耐性細胞を取得し、
- 10 (4)選択したネオマイシン耐性細胞をメトトレキセート(MTX)を含んだ培養培地にて培養して、MTX耐性の細胞を取得し、および(5)選択したMTX耐性細胞からrhMBPを回収する、工程を含んだ製造方法によって製造されたrhMBPである。

- native hMBPを構成するアミノ酸は、すでにHermanらによつ
- 15 て解析および報告されており[Sastry et al., "The human mannose-binding protein gene. Exon structure reveals its evolutionary relationship to a human pulmonary surfactant gene and localization to chromosome 10", J. Exp. Med. 170(4), 1175-1189 (1989)]、そのcDNA由来の塩基配
- 20 列を配列番号：1に、また、その塩基配列に対応するアミノ酸の一部を配列番号：28に示した。

- そして、本発明者は、その塩基配列の中でも、rhMBPのタンパク発現に関与する部分、すなわち、native hMBPを構成する塩基配列の66bp～812bpのcDNA部分(配列番号：2)を切り出
- 25 し、これを発現系に組み込むことで、rhMBPの生産系の確立を意図したのである。

[図面の簡単な説明]

- 第1図は、コレクチンの構成を説明する図である。
- 第2図は、ベクターpBBVの調製工程を説明する図である。
- 第3図は、プラスミドpCV3の調製工程を説明する図である。
- 5 第4図は、プラスミドpSVP(D)S-1の調製工程を説明する図である。
- 第5図は、プラスミドpSVP(D)S-2の調製工程を説明する図である。
- 第6図は、プラスミドpSVP(D)S/DHFRの調製工程を説明する
- 10 図である。
- 第7図は、プラスミドpSVP(D)S/NEOの調製工程を説明する図である。
- 第8図は、プラスミドpCV4の調製工程を説明する図である。
- 第9図は、ベクターpEXP-BL2の調製工程を説明する図である。
- 15 第10図は、プラスミドpNOW1の調製工程を説明する図である。
- 第11図は、プラスミドpNOW1の構造を示す図である。
- 第12図は、プラスミドpNOW1-hMBPの構造の模式図である。
- 第13図は、ネオマイシン(G418)耐性クローンでのrhMBPの産生状況を示すグラフである。
- 20 第14図は、MTX耐性クローンでのrhMBPの産生状況を示すグラフである。
- 第15図は、rhMBPのPAGE分析の結果を示す図である。
- 第16図は、rhMBPのゲル濾過分析の結果を示すグラフである。
- 第17図は、rhMBPとnative hMBPの糖結合活性を示すグラフで
- 25 ある。
- 第18図は、rhMBPの赤血球凝集抑制(HI)活性を示す図である。
- 第19図は、rhMBPによるインフルエンザAウイルス感染の中和活性を示すグラフである。



第20図は、rhMBPによるHIV-1、HBVおよびインフルエンザAウイルスへの結合活性を示すグラフである。

第21図は、rhMBPによるウイルス増殖（感染拡大）の阻止活性を示す図である。

- 5 第22図は、rhMBPによる感作ヒツジ赤血球の溶解度を示すグラフである。

#### [発明を実施するための最良の形態]

- 以下に本願発明のrhMBPに関して実施例に沿って詳細に説明するが、これら実施例の開示によって、本発明が限定的に解釈
- 10 されるべきでないことは勿論である。

- すなわち、プラスミドpNOW1の構築（実施例1）、発現ベクターpNOW1-hMBPの構築（実施例2）、ネオマイシン(G418)耐性細胞およびMTX耐性細胞からの発現クローンの選択（実施例
- 15 3）、rhMBPのPAGE分析およびゲル濾過クロマトグラフィーによる構造的検討（実施例4）、rhMBPとnative hMBPの糖結合活性の検討（実施例5）、赤血球凝集抑制(HI)試験（実施例6）、中和活性試験（実施例7）、ウイルス増殖〔感染拡大〕阻止試験（実施例8）、およびrhMBPの補体活性試験（実施例9）、
- 20 について以下に説明する。

#### 実施例1：プラスミドpNOW1の構築

##### (1)バックボーンベクターpBBVの調製（第2図）

- プラスミドpUC18（宝酒造株式会社）に、新たに組み込むマ
- 25 ルチクローニングサイト用のリンカー（BBVリンカー）として、配列番号：3に示す塩基配列を有するセンスDNAと、配列番号：4に示す塩基配列を有するアンチセンスDNAを合成した。
- このリンカーの制限酵素切断部位の配列は、3'-NdeI-SacII-

ClaI-EcoRV-SplI-EcoRI-ApaI-5'とし、5'末端は平滑末端  
(Blunt End)とした。プラスミドpUC18の1 ng (0.1  $\mu$ l)を制限  
酵素NdeIおよびPvuIIで処理することにより、lacZをコードす  
る領域を完全に除去した。この溶液に対して、BBVリンカー  
5 のセンスDNAとアンチセンスDNAをそれぞれ100pmole加え、次い  
で、DNAライゲーションキットVer.2 (宝酒造株式会社)のI液  
の2.0  $\mu$ lを加え、16°Cで、30分間反応させた。

反応液に大腸菌コンピテントセルXL1-BLUE (STRATAGENE社) 0.  
1mlを加え、氷上で30分間反応させた後、42°Cで、60秒間熱シ  
10 ョックを与えた。2分間氷上に置いた後、SOC培地 (東洋紡  
績株式会社)を0.9ml加え、37°Cで、1時間シェーカーで振と  
う培養した。5,000rpmで1分間遠心分離して、上清を廃棄し  
た。遠心管内に残った溶液で沈殿したコンピテントセルを懸  
濁し、1:10の割合で2枚の100  $\mu$ g/mlのアmpiシリンを含む  
15 アmpiシリンプレートに播いた。37°Cで、1晩培養し、生じ  
たコロニーから得られたプラスミドの内、BBVリンカーのDNAが  
挿入されているものを選択し、それらをベクターpBBVとした。

### (2) プラスミドpCV3の調製 (第3図)

プラスミドpUC119 (宝酒造株式会社)のマルチクローニング  
20 サイトを除去して、新たに組み込むマルチクローニングサイト  
用のリンカー (CV3リンカー)として、配列番号: 5に示す塩基  
配列を有するセンスDNAと、配列番号: 6に示す塩基配列を有  
するアンチセンスDNAを合成した。このリンカーの制限酵素  
切断部位の配列は、5'-HindIII-SacII-PstI-BamHI-ClaI-3'と  
25 し、また、3'末端はBlunt Endとした。プラスミドpUC119の  
1 ng (0.1  $\mu$ l)を、制限酵素HindIIIおよびEcoRIで処理した。  
得られたプラスミドを含む溶液に対して、CV3リンカーのセン  
スDNAとアンチセンスDNAをそれぞれ100pmole加え、次いで、

DNAライゲーションキットVer.2 (宝酒造株式会社) のI液の  
2.0  $\mu$ lを加え、16℃で、30分間反応させた。

- 反応液を大腸菌コンピテントセルXL1-BLUE (STRATAGENE社)  
0.1mlに加え、氷上で30分間反応させた後、42℃で、60秒間熱  
5 ショックを与えた。 2分間氷上に置いた後、SOC培地 (東洋  
紡績株式会社) を0.9ml加え、37℃で、1時間シェーカーで振  
とう培養した。 5,000rpmで1分間遠心分離して、上清を廃棄  
した。 遠心管内に残った溶液で沈殿したコンピテントセルを  
懸濁し、1:10の割合で2枚の100  $\mu$ g/mlのアンプシリンを含  
10 むアンプシリンプレートに播いた。 37℃で、1晩培養し、生  
じたコロニーから得られたプラスミドの内、CV3リンカーのDNA  
が挿入されているものを選択し、それらを (SV40関連遺伝子ク  
ローニング用の) プラスミドpCV3とした。

### (3) プラスミドpSVP(D)S-1の調製 (第4図)

#### 15 (3-1) プラスミドpSVP1aの調製

- pBR322上にBamHIでライゲーションしたSV40ウイルスの全DNA  
を有するプラスミドpSV40/BR (広島大学から入手) から、SV40  
Oriを含むSV40初期プロモーターを切り出すために、配列番号  
: 7 に示す塩基配列を有する5'センスプライマー (PS1) と、配  
20 列番号: 8 に示す塩基配列を有する3'アンチセンスプライマー  
(PS2) を合成した。 PS1プライマーの5'側末端には、元の配列  
のPvuIIサイトの代わりに、SacII-EcoRIの制限酵素サイトを付  
与した。 また、PS2プライマーの3'側末端には、元のHindIII  
サイトの代わりにPstIサイトを付与した。 pSV40/BRゲノム  
25 (pSV40/BR由来、広島大学から入手) 1ng (0.1  $\mu$ l) に対して、  
PS1プライマーとPS2プライマーをそれぞれ100pmole加え、Taq  
ポリメラーゼ (宝酒造株式会社) 2.5U (0.5  $\mu$ l) とPCR用緩衝液  
(250mM Tris-塩酸 (25℃でpH 8.3)、375mM塩化カリウム、15mM

塩化マグネシウム)20  $\mu$ l、100mM DTT 1.0  $\mu$ l、10mM dNTP 0.5  $\mu$ l (10mM dATP、dCTP、dGTP、dTTP)、酢酸BSA (4 mg/ml) 0.25  $\mu$ lを加え、最終容量が100  $\mu$ lになるように滅菌水を加えた。

- これらの混合溶液に鋳油 (Sigma Chemical社) を一滴添加し、
- 5 以下の条件でPCRを行った。すなわち、95℃で4分間の加熱処理後、95℃で1分間、55℃で1分間および72℃で2分間の3工程を30回繰り返してから、72℃で10分間の処理を行って反応を終了した。このPCR反応溶液から水相を取り出し、その内の10  $\mu$ lに、10×H溶液2  $\mu$ lを加え、次いで、制限酵素 SacII
- 10 20U (1  $\mu$ l) および PstI 20U (1  $\mu$ l) を加え、滅菌水を7  $\mu$ l加えた後に、37℃で1時間反応させた。反応液は、0.8%アガロースゲルを用いた50mA 30分間の電気泳動に付した。ゲルに波長360nmの紫外線を照射して検出された約0.35kbのバンドを切り出した。このアガロース断片を、1.5ml容のチューブに
- 15 入れ遠心分離機で、15,000rpmで、10分間遠心し、得られた水溶液をピペットで分離してDNA溶液とした。プラスミドpCV3を、SacIIおよびPstIで処理した後の溶液に対して、上記のDNA溶液5  $\mu$ lを加え、次いで、DNAライゲーションキットVer.2
- (宝酒造株式会社) の1液の2.0  $\mu$ lを加え、16℃で、30分間反
- 20 応させた。反応液に大腸菌コンピテントセルXL1-BLUE (STRATAGENE社) 0.1mlを加え、氷上で30分間反応させた後、42℃で、60秒間熱ショックを与えた。2分間氷上に置いた後、SOC培地 (東洋紡績株式会社) を0.9ml加え、37℃で、1時間シェーカーで振とう培養した。5,000rpmで1分間遠心分離して、
- 25 上清を廃棄した。遠心管内に残った溶液で沈殿したコンピテントセルを懸濁し、1:10の割合で2枚の100  $\mu$ g/mlのアンプシリンを含むアンプシリンプレートに播いた。37℃で、1晩培養し、生じたコロニーから得られたプラスミドの内、SV40プ

ロモーターのDNAが挿入されているものを選択し、それらを pSV0aとした。さらに、このプラスミドについて制限酵素 SphIでセルフライゲーション(self-ligation)を行い、エンハンサー部分を除去することにより、5'末端にSacII-EcoRIサイトが付いたPsv40DEを有する、プラスミドpSVP1aが調製された。

### (3-2) プラスミドpSVP1bの調製

5'センスプライマー(PS1)の代わりに、配列番号：9に記載の塩基配列を有する他の5'センスプライマー(PS3)を合成した点を除き、実施例1(3-1)に記載の調製方法と同様にして、NEO遺伝子シストロン用SV40プロモーターPsv40DEを有するプラスミドpSVP1bを調製した。なお、P3プライマーは、5'末端にSacIIサイトのみを付けたものとした(EcoRIサイトは無し)。

### (3-3) SV40 polyAの調製

SV40ウイルスゲノム由来のポリアデニレーション(以下、「polyA」あるいは「ポリA」と称する)シグナルを有するプラスミドpSV40pA-A(pSV40/BR由来、広島大学より入手)のSV40 polyAシグナル配列の3'末端EcoRIサイトにSPSV40リンカーをライゲートすることで、EcoRIサイトをApaI-ClaIサイトに変更した。まず、SPSV40リンカーとして、配列番号：10に示す塩基配列を有するセンスDNAと、配列番号：11に示す塩基配列を有するアンチセンスDNAを合成した。

プラスミドpSV40pA-Aの1 ng(0.1  $\mu$ l)を、制限酵素EcoRIで消化した。得られた溶液に、SPSV40リンカーのセンスDNAとアンチセンスDNAをそれぞれ100 pmole加え、次いで、DNAライゲーションキットVer.2(宝酒造株式会社)のI液の2.0  $\mu$ lを加え、16℃で、30分間反応させた。

反応液を大腸菌コンピテントセルXL1-BLUE(STRATAGENE社) 0.

1mlに加え、氷上で30分間反応させた後、42℃で、60秒間熱ショックを与えた。2分間氷上に置いた後、SOC培地（東洋紡績株式会社）を0.9ml加え、37℃で、1時間シェーカーで振とう培養した。5,000rpmで1分間遠心分離して、上清を廃棄した。遠心管内に残った溶液で沈殿したコンピテントセルを懸濁し、1:10の割合で2枚の100 $\mu$ g/mlのアンプシリンを含むアンプシリンプレートに播いた。37℃で、1晩培養し、生じたコロニーから得られたプラスミドの内、SV40 polyAのDNAが挿入されているものを選択し、それらをプラスミドpSV40pA-Bとした。

#### (3-4) プラスミドpSVP(D)S-1の調製

プラスミドpSV40pA-Bの1ng(0.1 $\mu$ l)に制限酵素BamHI 20U(1 $\mu$ l)およびClaI 20U(1 $\mu$ l)を加え、滅菌水を7 $\mu$ l加えた後に、37℃で1時間反応させた。反応液は、0.8%アガロースゲルを用いた50mA 30分間の電気泳動に付した。ゲルに波長360nmの紫外線を照射して検出された約0.8kbのバンドを切り出した。このアガロース断片を、1.5ml容のチューブに入れ遠心分離機で、15,000rpmで、10分間遠心し、得られた水溶液をピペットで分離してDNA溶液とした。一方、プラスミドpSV1aを、BamHIおよびClaIで処理した後、得られた溶液1ng/0.1 $\mu$ lに対して上記のDNA溶液5 $\mu$ lを加え、次いで、DNAライゲーションキットVer.2（宝酒造株式会社）のI液の2.0 $\mu$ lを加え、16℃で、30分間反応させた。反応液を大腸菌コンピテントセルXL1-BLUE(STRATAGENE社) 0.1mlに加え、氷上で30分間反応させた後、42℃で、60秒間熱ショックを与えた。2分間氷上に置いた後、SOC培地（東洋紡績株式会社）を0.9ml加え、37℃で、1時間シェーカーで振とう培養した。5,000rpmで1分間遠心分離して、上清を廃棄した。遠心管内に残った溶液

で沈殿したコンピテントセルを懸濁して、1 : 10の割合で2枚の100  $\mu$ g/mlのアンピシリンを含むアンピシリプレートに播いた。37℃で、1晩培養し、生じたコロニーから得られたプラスミドの内、新たにSV40 polyAのDNAが挿入されているもの  
5 を選択し、それらをプラスミドpSVP(D)S-1とした。

#### (4) プラスミドpSVP(D)S-2の調製 (第5図)

実施例1(3)に記載のプラスミドpSVP(D)S-1の調製方法と同様に、pSV40pA-Bから得られたSV40 polyAのDNAとプラスミドpSVP1bを元にして、NEO遺伝子シストロン用のSV40プロモーターとSV40polyAを有するプラスミドpSVP(D)S-2を得た。  
10

#### (5) プラスミドpSVP(D)S/DHFRの調製 (第6図)

##### (5-1) DHFR遺伝子のクローニング

マウス繊維芽細胞株3T3を培養し、 $10^7$ 個の細胞を得た後、グアニジンイソチオシアネート法(Meth. Enzymol., 152, 219頁、  
15 1987年)によりmRNAを分離した。まずフラスコ中に細胞を浮遊させ、得られた細胞を滅菌処理したPBS中に再度浮遊させ、遠心分離用チューブに移した。0℃以下の温度条件下で、450×gで、10分間遠心分離を行い、上清は廃棄した。6MのGTG-CsCl、10mMクエン酸ナトリウム、0.1ml  $\beta$ -メルカプトエ  
20 タノールおよび0.5%サルコシルの混合溶液に、得られた細胞を加えて懸濁・溶解し、これを18ゲージの注射針に通して、RNAを断片化した。このようにして得た溶液の2.5mlを、超遠心管中の5.7M CsCl、2.5mlの0.1M EDTA液の上に重層した。これを超遠心機を用いて、35,000rpmで、8時間遠心し、上清  
25 を注意深く捨てた後に、底に沈殿したRNA画分をフェノールで抽出および飽和した滅菌水に溶解した。

次いで、沈殿物をエタノールを加えて、12,000rpmの遠心でRNAを沈殿させた。次いで、沈殿物をエタノールで3回洗浄

した後、風乾した。得られたRNAを、3 mlのRNaseフリーの水に再懸濁した。こうして得られたmRNA試料の濃度は、260nmの吸光度により、約 $0.3 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ であった。

#### (5-2) DHFR cDNAの調製

- 5 DHFRの遺伝子を増幅するために、配列番号：12に示す塩基配列を有する5'センスプライマー(PD1)と、配列番号：13に示す塩基配列を有する3'アンチセンスプライマー(PD2)を合成した。
- 5'側末端は、PstIサイトとナンセンスなピリミジン配列「TCCTC」を人為的に結合された配列とし、3'側末端は、終止コドンから約85b下流にあるBglIIサイトまで含むものとした。
- cDNAを合成するために、 $2 \mu\text{g}$ の全RNAを含む $10 \mu\text{l}$ の溶液を用いた。滅菌したRNaseフリーのチューブに、PCR用緩衝液(250 mM Tris-塩酸 (25℃でpH 8.3)、375mM塩化カリウム、15mM塩化マグネシウム) $20 \mu\text{l}$ 、100mM DTT  $1.0 \mu\text{l}$ 、10mM dNTP  $0.5 \mu\text{l}$
- 15 (10mM dATP、dCTP、dGTP、dTTP)、酢酸BSA(4 mg/ml) $0.25 \mu\text{l}$ 、オリゴdTプライマー $2.0 \mu\text{g}$ 、PCR逆転写酵素(200単位/ $\mu\text{l}$ ) $0.5 \mu\text{l}$ に、 $0.5 \mu\text{l}$ のRNaseフリーのDEPC水を加えた。これらを、37℃で60分間インキュベートした後、70℃で15分間加熱して、反応を停止させた。得られたcDNAは、用意したPCR用の反応
- 20 液に直接加えた。この溶液にPD1プライマーとPD2プライマーを、それぞれ100pmole加え、次いで、Taqポリメラーゼ(宝酒造株式会社) 2.5U( $0.5 \mu\text{l}$ )とPCR用緩衝液(250mM Tris-塩酸(25℃でpH 8.3)、375mM塩化カリウム、15mM塩化マグネシウム)  $20 \mu\text{l}$ 、100mM DTT  $1.0 \mu\text{l}$ 、10mM dNTP  $0.5 \mu\text{l}$ (10mM dATP、dCTP、
- 25 dGTP、dTTP)、酢酸BSA(4 mg/ml) $0.25 \mu\text{l}$ を加え、最終容量が $100 \mu\text{l}$ になるように滅菌水を加えた。これらの混合溶液に鉱油(Sigma Chemical社)を一滴添加し、以下の条件でPCRを行った。すなわち、95℃で4分間の加熱処理後、95℃で1分間、



- 55℃で1分間および72℃で2分間の3工程を30回繰り返してから、72℃で10分間の処理を行って反応を終了した。このPCR反応溶液から水相を取り出し、その内の10 $\mu$ lに、10 $\times$ H溶液2 $\mu$ lを加え、次いで、制限酵素PstI 20U(1 $\mu$ l)およびBglII 20U(1 $\mu$ l)を加え、滅菌水を7 $\mu$ l加えた後に、37℃で1時間反応させた。反応液は、0.8%アガロースゲルを用いた50mA 30分間の電気泳動に付した。ゲルに波長360nmの紫外線を照射して検出された約0.65kbのバンドを切り出した。このアガロース断片を、1.5ml容のチューブに入れ遠心分離機で、
- 10 15,000rpmで、10分間遠心し、得られた水溶液をピペットで分離してDNA溶液とした。

#### (5-3) プラスミドpSVP(D)S/DHFRの調製

- プラスミドpSVP(D)S-1を制限酵素PstIおよびBamHIで部分消化処理した(これはSV40 polyA中にもPstIサイトが1箇所含まれることによる)。この溶液0.1 $\mu$ l(1 ng DNA)に対してDHFRのDNA溶液0.5 $\mu$ lを加え、5'末端はPstIで、また、3'末端はBamHIとBglIIの突出末端で結合させた。この時に、DNAライゲーションキットVer.2(宝酒造株式会社)のI液の2.0 $\mu$ lを加え、16℃で、30分間反応させた。反応液を大腸菌コンピテ
- 20 ントセルXL1-BLUE(STRATAGENE社)0.1mlに加え、氷上で30分間反応させた後、42℃で、60秒間熱ショックを与えた。2分間氷上に置いた後、SOC培地(東洋紡績株式会社)を0.9ml加え、37℃で、1時間シェーカーで振とう培養した。5,000rpmで1分間遠心分離して、上清を廃棄した。
- 25 遠心管内に残った溶液で沈殿したコンピテントセルを懸濁し、1:10の割合で2枚の100 $\mu$ g/mlのアンピシリンを含むアンピシリンプレートに播いた。37℃で、1晩培養し、生じたコロニーから得られたプラスミドの内、DHFRのDNAとApaIの制限酵

素サイトを有するプラスミドを選択し、それらをプラスミド pSVP(D)S/DHFRとした。

(6) プラスミド pSVP(D)S/NEO の調製 (第 7 図)

ネオマイシンフォスフトランスフェラーゼ遺伝子 (NEO 遺伝子) 領域には、354塩基からなる 5' 上流のトランスポゾン配列と NEO 遺伝子翻訳領域がつながったものを使用した。この配列は、Tn5由来のもので、pSV2-neo (J. Mol. Appl. Genet., p. 1327 (1982)) に含まれているものであり、pSV2-neo から切り出して使用した。まず、配列番号: 14 に示す塩基配列を有する 5' センスプライマー (PN1) と、配列番号: 15 に示す塩基配列を有する 3' アンチセンスプライマー (PN2) を合成した。PN1 プライマーの 5' 側末端には、元の配列の HindIII サイトの代わりに、PstI サイトを付与した。また、PN2 プライマーの 3' 側末端には、元の SmaI サイトの代わりに BamHI サイトを付与した。

15 pSV2-neo ゲノム 1 ng (0.1  $\mu$ l) に対して、PN1 プライマーと PN2 プライマーをそれぞれ 100 pmole 加え、次いで、Taq ポリメラーゼ (宝酒造株式会社) 2.5U (0.5  $\mu$ l) と PCR 用緩衝液 (250mM Tris-塩酸 (25℃ で pH 8.3)、375mM 塩化カリウム、15mM 塩化マグネシウム) 20  $\mu$ l、100mM DTT 1.0  $\mu$ l、10mM dNTP 0.5  $\mu$ l (10mM dATP、

20 dCTP、dGTP、dTTP)、酢酸 BSA (4 mg/ml) 0.25  $\mu$ l を加え、最終容量が 100  $\mu$ l になるように滅菌水を加えた。これらの混合溶液に 鉱油 (Sigma Chemical 社) を一滴添加し、以下の条件で PCR を行った。すなわち、95℃ で 4 分間の加熱処理後、95℃ で 1 分間、55℃ で 1 分間および 72℃ で 2 分間の 3 工程を 30 回繰り返してから、72℃ で 10 分間の処理を行って反応を終了した。この PCR 反応溶液から水相を取り出し、その内の 10  $\mu$ l に、10×H 溶液 2  $\mu$ l を加え、次いで、制限酵素 PstII 20U (1  $\mu$ l) および BamHI 20U (1  $\mu$ l) を加え、滅菌水を 7  $\mu$ l 加えた後に、37℃ で

1 時間反応させた。 反応液は、0.8%アガロースゲルを用いた50mA 30分間の電気泳動に付した。 ゲルに波長360nmの紫外線を照射して検出された約1.3kbのバンドを切り出した。

このアガロース断片を、1.5ml容のチューブに入れ遠心分離  
5 機で、15,000rpmで、10分間遠心し、得られた水溶液をピペットで分離してDNA溶液とした。

次に、プラスミドpSVP(D)S-2を制限酵素PstIおよびBamHIで部分消化処理した（これはSV40 polyA中にもPstIサイトが1箇所含まれることによる）。 この溶液0.1 $\mu$ l(1 ng DNA)に対して  
10 NEO遺伝子のDNA溶液0.5 $\mu$ lを加え、PstI-BamHIサイトにライゲートした。

この反応には、DNAライゲーションキットVer.2（宝酒造株式会社）のI液の2.0 $\mu$ lを加え、16℃で、30分間反応させた。 反応液を大腸菌コンピテントセルXL1-BLUE(STRATAGENE社) 0.1  
15 mlに加え、氷上で30分間反応させた後、42℃で、60秒間熱ショックを与えた。

2 分間氷上に置いた後、SOC培地（東洋紡績株式会社）を0.9 ml加え、37℃で、1 時間シェーカーで振とう培養した。

5,000rpmで1 分間遠心分離して、上清を廃棄した。 遠心管内  
20 に残った溶液で沈殿したコンピテントセルを懸濁し、1 : 10の割合で2 枚の100 $\mu$ g/mlのアンピシリンを含むアンピシリンプレートに播いた。 37℃で、1 晩培養し、生じたコロニーから得られたプラスミドの内、NEO遺伝子を含むトランスポゾン配列DNAが挿入されているものをG418耐性に関して選択した。

25 さらに、NEO遺伝子翻訳領域開始コドン“ATG”の直後の塩基を“A”から“C”に変更するために、配列番号：16に示した塩基配列を有する変異導入用のアンチセンスプライマーを合成した。  
pSVP(D)S/NEOゲノム1 ng(1 $\mu$ l)に対して、このアンチセンス

プライマーを100pmole加え、PCR in vitro Mutagenesis Kit (宝酒造株式会社) を使用して部位特異的突然変異を誘導した。

Taqポリメラーゼ (宝酒造株式会社) 2.5U(0.5  $\mu$ l)とPCR用緩衝液(250mM Tris-塩酸 (25°CでpH 8.3)、375mM塩化カリウム、  
5 15mM塩化マグネシウム)20  $\mu$ l、100mM DTT 1.0  $\mu$ l、10mM dNTP 0.5  $\mu$ l(10mM dATP、dCTP、dGTP、dTTP)、酢酸BSA(4 mg/ml) 0.25  $\mu$ lを加え、最終容量が100  $\mu$ lになるように滅菌水を加えた。これらの混合溶液に鉱油(Sigma Chemical社)を一滴添加し、以下の条件でPCRを行った。

10 すなわち、95°Cで4分間の加熱処理後、95°Cで1分間、55°Cで1分間および72°Cで2分間の3工程を30回繰り返してから、72°Cで10分間の処理を行って反応を終了した。このようにして得られたプラスミドベクターを、プラスミドpSVP(D)S/NEOとした。

15 (7) プラスミドpEXP-BL2の調製

(7-1) プラスミドpCV4の調製 (第8図)

プラスミドpUC18 (宝酒造株式会社) のマルチクローニングサイトを除去して、新たにマルチクローニングサイト(MCS)関連遺伝子を組み込むためのマルチクローニングサイト用のリン  
20 カー(CV4リンカー)として、配列番号:17に示す塩基配列を有するセンスDNAと、配列番号:18に示す塩基配列を有するアンチセンスDNAを合成した。

このリンカーの制限酵素切断部位の配列を、3'-HindIII-EcoRV-ClaI-NotI-KpnI-XbaI-BalIII-SplI-EcoRI-5'とした。プラス  
25 ミドpUC18の1 ng(0.1  $\mu$ l)を制限酵素HindIIIおよびEcoRIで処理した。

得られたプラスミドを含む溶液に対して、CV4リンカーのセンスDNAとアンチセンスDNAをそれぞれ100pmole加え、次いで、

DNAライゲーションキットVer.2 (宝酒造株式会社) のI液の  
2.0  $\mu$ lを加え、16℃で、30分間反応させた。反応液を大腸菌  
コンピテントセルXL1-BLUE (STRATAGENE社) 0.1mlに加え、氷上  
で30分間反応させた後、42℃で、60秒間熱ショックを与えた。

- 5 2分間氷上に置いた後、SOC培地 (東洋紡績株式会社) を0.9  
ml加え、37℃で、1時間シェーカーで振とう培養した。5,000  
rpmで1分間遠心分離して、上清を廃棄した。遠心管内に残  
った溶液で沈殿したコンピテントセルを懸濁して、1:10の割  
合で2枚の100  $\mu$ g/mlのアンプシリンを含むアンプシリンプレ  
10 ートに播いた。37℃で、1晩培養し、生じたコロニーから得  
られたプラスミドの内、CV4リンカーのDNAが挿入されているも  
のを選択し、それらをプラスミドpCV4とした。

#### (7-2) P<sub>CMV</sub>の調製 (第9図)

- hCMV MIE抗原のプロモーター/エンハンサー領域を含む約6  
15 kbの配列をpSV2-Neoに組み込んで調製されたプラスミドpSV2-  
neo/EcoH (東海大より入手) からP<sub>CMV</sub>を切り出すために、配  
列番号: 19に示す塩基配列を有する5'センスプライマー (PC1)  
と、配列番号: 20に示す塩基配列を有する3'アンチセンスプ  
ライマー (PC2) を合成した。PC1プライマーの5'側末端には、  
20 EcoRVサイトを、またPC2プライマーの3'側末端には、ClaIサイ  
トを付与した。プラスミドpSV2-neo/EcoHゲノム1 ng (1  $\mu$ l)  
に対して、これらPC1プライマーとPC2プライマーをそれぞれ  
100 pmole加え、次いで、Taqポリメラーゼ (宝酒造株式会社)  
2.5 U (0.5  $\mu$ l) とPCR用緩衝液 (250 mM Tris-塩酸 (25℃でpH 8.3)、  
25 375 mM塩化カリウム、15 mM塩化マグネシウム) 20  $\mu$ l、100 mM DTT  
1.0  $\mu$ l、10 mM dNTP 0.5  $\mu$ l (10 mM dATP、dCTP、dGTP、dTTP)、  
酢酸BSA (4 mg/ml) 0.25  $\mu$ lを加え、最終容量が100  $\mu$ lになるよ  
うに滅菌水を加えた。これらの混合溶液に鉍油 (Sigma

Chemical社)を一滴添加し、以下の条件でPCRを行った。すなわち、95℃で4分間の加熱処理後、95℃で1分間、55℃で1分間および72℃で2分間の3工程を30回繰り返してから、72℃で10分間の処理を行って反応を終了した。このPCR反応溶液から水相を取り出し、その内の10  $\mu$  lに、10×H溶液 2  $\mu$  lを加え、次いで、制限酵素 EcoRV 20U(1  $\mu$  l)および ClaI 20U(1  $\mu$  l)を、そして、滅菌水を 7  $\mu$  l加えた後に、37℃で1時間反応させた。

反応液は、0.8%アガロースゲルを用いた50mA 30分間の電気泳動に付した。ゲルに波長360nmの紫外線を照射して検出された約0.6kbのバンドを切り出した。このアガロース断片を、1.5ml容のチューブに入れ遠心分離機で、15,000rpmで、10分間遠心し、得られた水溶液をピペットで分離してDNA溶液とした。

### (7-3) Pcmvのプラスミドへの挿入

15 プラスミドpCV4の1 ng(1  $\mu$  l)を、制限酵素 EcoRVおよび ClaIで処理した後の溶液に対して、PcmvのDNA溶液0.5  $\mu$  lを加え、EcoRV-ClaIサイトにライゲートした。この反応には、DNAライゲーションキットVer.2(宝酒造株式会社)のI液の2.0  $\mu$  lを加え、16℃で、30分間反応させた。反応液に大腸菌コンピテントセルXL1-BLUE(STRATAGENE社) 0.1mlを加え、氷上で30分間反応させた後、42℃で、60秒間熱ショックを与えた。2分間氷上に置いた後、SOC培地(東洋紡績株式会社)を0.9ml加え、37℃で、1時間シェーカーで振とう培養した。5,000 rpmで1分間遠心分離して、上清を廃棄した。

25 遠心管内に残った溶液で沈殿したコンピテントセルを懸濁して、1:10の割合で2枚の100  $\mu$  g/mlのアンプシリンを含むアンプシリンプレートに播いた。37℃で、1晩培養し、生じたコロニーから得られたプラスミドの内、PcmvのDNAが挿入さ

れているものを選択し、それらをpCV4/CMVとした。

#### (7-4) bGH polyAを含むDNAの単離

- 採取したウシ肝臓細胞組織をドライアイス上でスライスしながら、100  $\mu$ g/mlになるようにプロティネースK溶液を加えた
- 5 緩衝液(150mM 塩化ナトリウム、10mM Tris-塩酸(pH 8.0)、10 mM EDTA、0.1% SDS)で抽出し、穏やかに混合した。 55℃で、1 時間インキュベートした後、さらに37℃で、一晚インキュベートした。 Trisで平衡化した中性フェノールを等量加え、室温で20分間穏やかに混合した。
- 10 室温で、2,000  $\times$  g、10分間の遠心分離を行い、得られた上層(5 ml)を回収し、新しいチューブに移した後、再度同じ条件で遠心分離を行った。 再度上層を回収し、新しいチューブに移した後、改めて同じ条件で遠心分離を行った。 再び上層を回収し、新しいチューブに移した後、2 倍量の100%エタノール
- 15 ルを重層し、ゆっくりと攪拌しながら、緩衝液とエタノールを混合した。 得られたDNAをガラス棒で巻き取って回収した後、風乾し、5 mlのTE溶液に入れ、4℃で、一晚おきに溶解した。
- 得られたDNA試料の濃度は、260nmの吸光度によれば、約0.5  $\mu$ g/ $\mu$ lであった。

#### 20 (7-5) bGH polyAのプラスミドへの挿入

- bGH polyA配列を二重に接続するために、制限酵素サイトの異なる2種類のbGH polyA配列を調製した。 まず、2組の5' センスプライマーと3' アンチセンスプライマー、すなわち、配列番号：21に示す塩基配列を有する5' センスプライマー(PB11)
- 25 と、配列番号：22に示す塩基配列を有する3' アンチセンスプライマー(PB12)の組み合わせと、配列番号：23に示す塩基配列を有する5' センスプライマー(PB21)と、配列番号：24に示す塩基配列を有する3' アンチセンスプライマー(PB22)の組み合わせを

合成した。

得られたDNA試料の内の100ngを取り、PCRテンプレートを  
用いて所望の制限酵素切断配列を両端に持つbGH polyA配列を調  
製した。

- 5      まず、DNA試料100ng(1  $\mu$  l)に対して、センスプライマーPB  
11とアンチセンスプライマーPB12を、それぞれ100pmole加え、  
Taqポリメラーゼ(宝酒造株式会社) 2.5U(0.5  $\mu$  l)とPCR用緩衝  
液(250mM Tris-塩酸(25℃でpH 8.3)、375mM塩化カリウム、15  
mM塩化マグネシウム)20  $\mu$  l、100mM DTT 1.0  $\mu$  l、10mM dNTP  
10   0.5  $\mu$  l(10mM dATP、dCTP、dGTP、dTTP)、酢酸BSA(4 mg/ml)  
0.25  $\mu$  lを加え、最終容量が100  $\mu$  lになるように滅菌水を加え  
た。これらの混合溶液に鉱油(Sigma Chemical社)を一滴添  
加し、以下の条件でPCRを行った。

- すなわち、95℃で4分間の加熱処理後、95℃で1分間、55℃  
15   で1分間および72℃で2分間の3工程を30回繰り返してから、  
72℃で10分間の処理を行って反応を終了した。このPCR反応  
溶液から水相を取り出し、その内の10  $\mu$  lに、10×H溶液2  $\mu$  l  
を加え、次いで、制限酵素XbaI 20U(1  $\mu$  l)およびBglII 20U  
(1  $\mu$  l)を加え、滅菌水を7  $\mu$  l加えた後に、37℃で1時間反応  
20   させた。

- 反応液は、0.8%アガロースゲルを用いた50mA 30分間の電気  
泳動に付した。ゲルに波長360nmの紫外線を照射して検出さ  
れた約0.23kbのバンドを切り出した。このアガロース断片を、  
1.5ml容のチューブに入れ遠心分離機で、15,000rpmで、10分間  
25   遠心し、得られた水溶液をピペットで分離してDNA溶液とした。

プラスミドpCV4/CMVを、XbaIおよびBglIIで処理した後の溶  
液0.1  $\mu$  l(1 ngDNA)に対して、前記のDNA溶液0.5  $\mu$  lを加え、次  
いで、DNAライゲーションキットVer.2(宝酒造株式会社)のI



液の2.0 $\mu$ lを加え、16℃で、30分間反応させた。

反応液を大腸菌コンピテントセルXL1-BLUE (STRATAGENE社) 0.1mlに加え、氷上で30分間反応させた後、42℃で、60秒間熱ショックを与えた。2分間氷上に置いた後、SOC培地 (東洋紡績株式会社) を0.9ml加え、37℃で、1時間シェーカーで振とう培養した。

5,000rpmで1分間遠心分離して、上清を廃棄した。遠心管内に残った溶液で沈殿したコンピテントセルを懸濁して、1:10の割合で2枚の100 $\mu$ g/mlのアンピシリンを含むアンピシリンプレートに播いた。37℃で、1晩培養し、生じたコロニーから得られたプラスミドの内、bGH polyA DNAが挿入されているものを選択し、それらをプラスミドpCV4/CMV-bGH1とした。

#### (7-6) ベクターpEXP-BL2の調製

プライマーPB11とPB12からPCR増幅して得られたDNA試料の内  
15 の1ngを取り、これにセンスプライマーPB21とアンチセンスプライマーPB22を、それぞれ100pmole加え、次いで、Taqポリメラーゼ (宝酒造株式会社) 2.5U (0.5 $\mu$ l) とPCR用緩衝液 (250mM Tris-塩酸 (25℃でpH 8.3)、375mM塩化カリウム、15mM塩化マグネシウム) 20 $\mu$ l、100mM DTT 1.0 $\mu$ l、10mM dNTP 0.5 $\mu$ l (10  
20 mM dATP、dCTP、dGTP、dTTP)、酢酸BSA (4 mg/ml) 0.25 $\mu$ lを加え、最終容量が100 $\mu$ lになるように滅菌水を加えた。これらの混合溶液に鉍油 (Sigma Chemical社) を一滴添加し、以下の条件でPCRを行った。すなわち、95℃で4分間の加熱処理後、95℃で1分間、55℃で1分間および72℃で2分間の3工程を30  
25 回繰り返してから、72℃で10分間の処理を行って反応を終了した。このPCR反応溶液から水相を取り出し、その内の10 $\mu$ lに、10 $\times$ H溶液 2 $\mu$ lを加え、次いで、制限酵素BamHI 20U (1 $\mu$ l) およびSplI 20U (1 $\mu$ l)を加え、滅菌水を7 $\mu$ l加えた後に、37℃

で1時間反応させた。反応液は、0.8%アガロースゲルを用いた50mA 30分間の電気泳動に付した。ゲルに波長360nmの紫外線を照射して検出された約0.47kbのバンドを切り出した。

このアガロース断片を、1.5ml容のチューブに入れ遠心分離機で、15,000rpmで、10分間遠心し、得られた水溶液をピペットで分離してDNA溶液とした。

プラスミドpCV4/CMV-bGH1を、BglIIおよびSplIで処理した後の溶液0.1 $\mu$ l(1 ng DNA)に対して、前記のDNA溶液0.5 $\mu$ lを加え、次いで、DNAライゲーションキットVer.2(宝酒造株式会社)のI液の2.0 $\mu$ lを加え、16℃で、30分間反応させた。反応液を大腸菌コンピテントセルXL1-BLUE(STRATAGENE社) 0.1mlに加え、氷上で30分間反応させた後、42℃で、60秒間熱ショックを与えた。2分間氷上に置いた後、SOC培地(東洋紡績株式会社)を0.9ml加え、37℃で、1時間シェーカーで振とう培養した。5,000rpmで1分間遠心分離して、上清を廃棄した。

遠心管内に残った溶液で沈殿したコンピテントセルを懸濁して、1:10の割合で2枚の100 $\mu$ g/mlのアンピシリンを含むアンピシリンプレートに播いた。37℃で、1晩培養し、生じたコロニーから得られたプラスミドの内、第二のbGH polyA DNAが挿入されているもの、つまりbGH polyAが二重に結合して挿入されているもの((bGH polyA)<sup>2</sup>)を選択し、それらをMCSシストロンをもつカセットベクターpEXP-BL2とした。

#### (8) プラスミドpNOW1の調製 (第10図)

##### (8-1) プラスミドpNOW-aの調製

プラスミドpSVP(D)S/DHFR 100ng(1 $\mu$ l)に10×H溶液1 $\mu$ lを加え、制限酵素EcoRI 20U(1 $\mu$ l)およびApaI 20U(1 $\mu$ l)を加え、37℃で1時間反応させた。反応液は、0.8%アガロースゲルを用いた50mA 30分間の電気泳動に付した。ゲルに波長

360nmの紫外線を照射して検出された約1.75kbのバンドを切り出した。このアガロース断片を、1.5ml容のチューブに入れ遠心分離機で、15,000rpmで、10分間遠心し、得られた水溶液をピペットで分離してDNA溶液とした。このDNA配列は、DHFR

5 遺伝子シストロンを構成するものであり、Psv40DE、Mu-DHFR（変異）遺伝子およびSV40 polyAからなる配列であった。

一方、DHFR遺伝子シストロンを構成するDNA配列が挿入されるプラスミドpBBVの1ng(1 $\mu$ l)を、制限酵素EcoRIおよびApaIで処理した。得られたプラスミドを含む溶液に対して、

10 DHFR遺伝子シストロンを構成する配列のDNA溶液0.5 $\mu$ lを加え、EcoRI-ApaIサイトにライゲートした。この反応には、DNAライゲーションキットVer.2（宝酒造株式会社）のI液の2.0 $\mu$ lを加え、16℃で、30分間反応させた。反応液を大腸菌コンピテントセルXL1-BLUE（STRATAGENE社）0.1mlに加え、氷上で

15 30分間反応させた後、42℃で、60秒間熱ショックを与えた。

2分間氷上に置いた後、SOC培地（東洋紡績株式会社）を0.9ml加え、37℃で、1時間シェーカーで振とう培養した。5,000rpmで1分間遠心分離して、上清を廃棄した。遠心管内に残った溶液で沈殿したコンピテントセルを懸濁して、1:10の割合で2枚の100 $\mu$ g/mlのアンピシリンを含むアンピシリンプレートに播いた。

20

37℃で、1晩培養し、生じたコロニーから得られたプラスミドの内、新たにDHFR遺伝子シストロンを構成するDNAが挿入されているものを選択し、それらをプラスミドpNOW-aとした。

25 (8-2) プラスミドpNOW-bpの調製

プラスミドpSVP(D)S/NEO 100ng(1 $\mu$ l)に10 $\times$ H溶液1 $\mu$ lを加え、制限酵素SacII 20U(1 $\mu$ l)およびClaI 20U(1 $\mu$ l)を加え、1時間反応させた。反応液は、0.8%アガロースゲルを

用いた50mA 30分間の電気泳動に付した。ゲルに波長360nmの紫外線を照射して検出された約2.4kbのバンドを切り出した。

このアガロース断片を、1.5ml容のチューブに入れ、遠心分離機で、15,000rpmで、10分間遠心し、得られた水溶液をピペットで分離してDNA溶液とした。このDNA配列は、NEO遺伝子シストロンを構成するものであり、Psv40DE、トランスポゾン配列、Mu-NEO（変異）遺伝子およびSV40 polyAからなる配列であった。

一方、NEO遺伝子シストロンを構成するDNA配列が挿入されるプラスミドpNOW-aの1ng(1 $\mu$ l)を、制限酵素SacIIおよびClaIで処理した。得られたプラスミドを含む溶液に対して、NEO遺伝子シストロンを構成する配列のDNA溶液0.5 $\mu$ lを加え、SacII-ClaIサイトにライゲートした。この反応には、DNAライゲーションキットVer.2（宝酒造株式会社）のI液の2.0 $\mu$ lを加え、16℃で、30分間反応させた。反応液を大腸菌コンピテントセルXL1-BLUE（STRATAGENE社）0.1mlに加え、氷上で30分間反応させた後、42℃で、60秒間熱ショックを与えた。2分間氷上に置いた後、SOC培地（東洋紡績株式会社）を0.9ml加え、37℃で、1時間シェーカーで振とう培養した。5,000rpmで1分間遠心分離して、上清を廃棄した。

遠心管内に残った溶液で沈殿したコンピテントセルを懸濁して、1:10の割合で2枚の100 $\mu$ g/mlのアンピシリンを含むアンピシリンプレートに播いた。37℃で、1晩培養し、生じたコロニーから得られたプラスミドの内、新たにNEO遺伝子シストロンを構成するDNAが挿入されているものを選択し、それらをプラスミドpNOW-bpとした。

#### (8-3) プラスミドpNOW-bの調製

得られたプラスミドpNOW-bpのマルチクローニングサイトの

- ClaIサイトを除去するために、ApaI-ClaI-EcoRV部分を新たに合成したApaI-EcoRVリンカーで置換することにより、ClaIサイトを除去した。まず、このリンカーとして、5'-CGAT-3'の塩基配列を有するセンスDNAと、3'-CGGGCTA-5'の塩基配列を有するアンチセンスDNAを合成した。プラスミドpNOW-bpの1 ng (0.1  $\mu$ l)を、制限酵素ApaIおよびEcoRVでダイジェスト処理した。得られたプラスミドを含む溶液に対して、ApaI-EcoRVリンカーセンスDNAとアンチセンスDNAをそれぞれ100pmole加え、次いで、DNAライゲーションキットVer.2 (宝酒造株式会社)のI液の2.0  $\mu$ lを加え、16°Cで、30分間反応させた。反応液を大腸菌コンピテントセルXL1-BLUE (STRATAGENE社) 0.1mlに加え、氷上で30分間反応させた後、42°Cで、60秒間熱ショックを与えた。2分間氷上に置いた後、SOC培地 (東洋紡績株式会社) を0.9ml加え、37°Cで、1時間シェーカーで振とう培養した。
- 5,000rpmで1分間遠心分離して、上清を廃棄した。遠心管内に残った溶液で沈殿したコンピテントセルを懸濁して、1:10の割合で2枚の100  $\mu$ g/mlのアンピシリンを含むアンピシリンプレートに播いた。37°Cで、1晩培養し、生じたコロニーから得られたプラスミドの内、新たにNEO遺伝子シストロンを構成するDNAが挿入されているものを選択し、それらをプラスミドpNOW-bとした。

#### (8-4) プラスミドpNOW1の調製

- プラスミドpEXP-BL2 100ng (1  $\mu$ l)に10×H溶液1  $\mu$ lを加え、制限酵素EcoRV 20U (1  $\mu$ l)およびSp11 20U (1  $\mu$ l)を加え、1時間反応させた。反応液は、0.8%アガロースゲルを用いた、50mA 30分間の電気泳動に付した。ゲルに波長360nmの紫外線を照射して検出された約1.1kbのバンドを切り出した。このアガロース断片を、1.5ml容のチューブに入れ、遠心分離機で、

15,000rpmで、10分間遠心し、得られた水溶液をピペットで分離してDNA溶液とした。このDNA配列は、MCSシストロンを構成するものであり、Pcmv、MCS-B、および(bGH polyA)<sup>2</sup>からなる配列であった。

- 5 一方、MCSシストロンを構成するDNA配列が挿入されるプラスミドpNOW-bの1ng(1 $\mu$ l)を制限酵素EcoRVおよびSplIで処理した。得られたプラスミドを含む溶液に対して、MCSシストロンを構成する配列のDNA溶液0.5 $\mu$ lを加え、EcoRV-SplIサイトにライゲートした。この反応には、DNAライゲーションキットVer.2(宝酒造株式会社)のI液の2.0 $\mu$ lを加え、16℃で、  
10 30分間反応させた。反応液に大腸菌コンピテントセルXL1-BLUE(STRATAGENE社)0.1mlを加え、氷上で30分間反応させた後、42℃で、60秒間熱ショックを与えた。

- 2分間氷上に置いた後、SOC培地(東洋紡績株式会社)を0.9  
15 ml加え、37℃で、1時間シェーカーで振とう培養した。5,000rpmで1分間遠心分離して、上清を廃棄した。遠心管内に残った溶液で沈殿したコンピテントセルを懸濁して、1:10の割合で2枚の100 $\mu$ g/mlのアンピシリンを含むアンピシリンプレートに播いた。37℃で、1晩培養し、生じたコロニーから得  
20 られたプラスミドの内、MCSシストロンを構成するDNAが挿入されているものを選択し、それらをpNOW1とした。

なお、プラスミドpNOW1の構造を第11図に示した。さらに、プラスミドpNOW1の全塩基配列を、配列番号:25に示した。

## 25 実施例2:発現ベクターpNOW1-hMBPの構築

まず、ヒト肝臓cDNAライブラリー(クローンラック社製)から、hMBPの開始コドンからストップコドンまでを、AAGGAAAAA GCGGCCGCATGTCCCTGTTTCCATCACTCの塩基配列(配列番号:26)か

らなるプライマーとGCTCTAGATCAGATAGGGAACTCACAGACの塩基配列（配列番号：27）からなるプライマーを用いて、ザイモリアクター（アトー社製）で増幅させた。

得られたhMBPのcDNAを制限酵素NotIとXbaIで消化して、hMBP  
5 のcDNAの66～812bpに対応するcDNA部分（配列番号：2）を得、これを挿入体とした。

次に、実施例1にて調製した発現ベクターpNOW1を、制限酵素NotIとXbaIで消化して、サイトメガロウイルスプロモーター（pCMV）の下流、すなわち、pCMVとBGPポリA（第11図での  
10 (bGHPA)<sup>2</sup>に相当する）の間に、前述の挿入体をDNAライゲーションキット（宝酒造製）を用いて挿入した。このようにして得られた発現ベクターをプラスミドpNOW1-hMBPと命名し、その構造の模式図を第12図に示した。

### 15 実施例3：発現クローンの選択

(1) ジヒドロ葉酸還元酵素欠損(dhfr<sup>-</sup>)のチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞への発現ベクターpNOW1-hMBPの導入

ウシ胎児血清(FCS, GIBCO社)を10%添加した(ヒポキサンチン、チミジンを含まない)Iscove's Modified Dulbecco's  
20 Medium(IMDM; GIBCO社)を調製し、これにDHFR遺伝子が欠損した(dhfr<sup>-</sup>)DG44 CHO細胞株を、 $1 \times 10^5$ 細胞/mlになるように混合し、これを直径60mmのディッシュに播種し、37℃で、5%炭酸ガス(CO<sub>2</sub>)の条件下で、24時間培養した。培養上清を廃棄し、その代わりに別途予め、5 μgのDNA（発現ベクターpNOW1-hMBP）をリポフェクチン溶液(DOTAPLiposomal Transfection Reagent; ベーリンガー・マンハイム社製)に混合して得た溶液  
25 100 μlを含む10% FCS添加IMDMを加えて6 mlとし、さらにヒポキサンチン(終濃度10nM) (GIBCO社製)とチミジン(終濃度100nM)

(GIBCO社製)を加え、16時間培養し、dhfr<sup>-</sup>の宿主CHO細胞への発現ベクターpNOW1-hMBPの導入を行った。その後、培養上清を廃棄し、10%FCS、ヒポキサンチン、チミジン添加IMDMの6 mlを加え、さらに24時間培養を行った。

5      (2)ネオマイシン(G418)耐性CHO細胞の取得

発現ベクターpNOW1-hMBPが導入された細胞を24時間培養した後、これをトリプシン処理して、ディッシュより回収し、細胞数を計測した後、 $1 \times 10^5$ 細胞/mlになるように400  $\mu$ g/mlの濃度のネオマイシン(G418)を含む10%FCS添加IMDMで細胞を懸濁  
10      したものを、0.1ml/ウェルの量で96ウェルのマイクロプレート10枚に播種(分注)した。37℃で、5%炭酸ガス(CO<sub>2</sub>)の条件下で、2週間培養したところ、96ウェル中の84個のウェルにおいて生存細胞があり、G418耐性の細胞(クローン)が認められた。

15      これらG418耐性クローンのhMBPの産生性を確認したところ、殆どのG418耐性クローンにおいて高水準の産生レベルが確認された。

hMBPの産生が確認されたクローンの中からいくつかを選択し、各クローンを、25cm<sup>2</sup>のカルチャーフラスコに播種した。細胞  
20      が密集するまで培養を行い、細胞数を測定したところ、 $3 \times 10^6$ 細胞/25cm<sup>2</sup>カルチャーフラスコであった。それぞれのカルチャーフラスコの培養上清を廃棄し、前出のものと同一組成の10%FCS添加IMDMを2 ml加え、4日間培養し、その培養上清を回収した。回収した培養上清中のhMBP(rhMBP)の産生量を  
25      測定したところ、いくつかのカルチャーフラスコで5  $\mu$ g/mlを超える産生量が確認された。なお、hMBPの産生量は、対照としてのnative MBP、コレクチンの糖認識領域(CRD)とネック領域に対する(大腸菌で発現させた)抗ウサギポリクローナル抗



体およびhMBP（定量対象）を用いて、鈴木らの方法（Y. Suzuki, et al., "Characterization of Recombinant Bovine Conglutinin Expressed in a Mammalian Cell", Biochem. Biophys. Res. Commun., 238, pp.856-863 (1997))に準じて定量した。そして、産生量が大きかった4つのクローンについての結果を、第13図のグラフに示した。産生効率の最も高いクローンでのhMBPの産生量は、 $23.3 \mu\text{g/ml}$ であった。

### (3) MTX耐性のCHO細胞の取得

hMBP産生クローンをさらに継代培養して安定化させた後、低濃度のMTXを培地に加えて遺伝子増幅を行った。

まず、 $5 \text{ nM}$  MTX、 $400 \mu\text{g/ml}$ のG418を加えた10%透析済FCS（JRHバイオサイエンス社製）添加IMDMに、選択した2つの各細胞クローンを混合し、 $0.1\text{ml}$ /ウェルの量を96ウェルのマイクロプレート10枚に播種（分注）した。 $37^\circ\text{C}$ で、5%炭酸ガス（ $\text{CO}_2$ ）の条件下で、2週間培養を行ったところ、960ウェル中のほとんどのウェルで生存細胞、すなわち、 $5 \text{ nM}$  MTX耐性の細胞（クローン）が認められた。これら $5 \text{ nM}$  MTX耐性のクローンのhMBP産生性を確認したところ、殆どの $5 \text{ nM}$  MTX耐性クローンにおいて高水準の産生レベルが確認された。これらクローンの中から5つのクローンを任意に選択し、それぞれを $25\text{cm}^2$ のカルチャーフラスコに播種し、細胞が密集するまで2週間培養した。

培養上清を廃棄し、前出のものと同一組成の10%FCS添加IMDM（ $5 \text{ nM}$  MTX、 $400 \mu\text{g/ml}$  G418を加えたもの）を $2\text{ml}$ 加え、4日間培養し、その培養上清を回収し、hMBPの産生レベルを確認した。なお、hMBPの産生量の定量は、実施例3(1)と同様の定量方法によって定量した。その結果を、第14図のグラフに示す。産生効率の最も高いクローンでのhMBPの産生量は、

54.1  $\mu$ g/mlであった。

実施例 4 : PAGE分析およびゲル濾過クロマトグラフィー  
による rhMBP の構造的検討

---

5 (1) rhMBP の精製

得られたクローンの中で最も産生効率の高いクローンを、  
225cm<sup>2</sup> のカルチャーフラスコに播種し、細胞が密集するまで培  
養した。そして、培養上清を廃棄し、5nM MTX、400  $\mu$ g/ml の  
G418を含む CHO-S-SFM II 培地(ビタミン C を添加する場合は終  
10 濃度 100mM になるようにビタミン C を添加)を 50ml 加え、4 日間  
培養した。その培養上清を回収し、TBS (TBS powder (宝酒造  
社製)より調製) に対して透析を行い、その後、TBSC (5mM  
CaCl<sub>2</sub>、TBS) に対して透析を行った。

次いで、マンナンーアガロース (mannan-agarose: SIGMA 社製)  
15 により精製を行った。すなわち、マンナンーアガロースをカ  
ラム (Column PD-10、Empty、ファルマシア社製) に詰め、そ  
こに透析済の培養液を通し、TBSC で洗浄後、TBSE (10mM EDTA、  
TBS) で溶出した。溶出後、1M CaCl<sub>2</sub> を終濃度が 15mM になるよ  
うに加え、さらに、もう一度、マンナンーアガロースに適用し、  
20 TBSC で洗浄後、100mM のマンノースを含む TBS で溶出し、再度、  
TBSC に対して透析を行い rhMBP の精製品とした。

(2) 精製 rhMBP の PAGE 分析

実施例 4 (1) で得た hMBP を、PAGE により解析した。SDS-PAGE  
には、非還元条件下では 4 ~ 20% の濃度勾配のポリアクリルア  
25 ミドゲル (第一化学薬品社製) を、還元条件下では 10 ~ 20% の  
濃度勾配のポリアクリルアミドゲル (第一化学薬品社製) を、  
また、native PAGE には 4 ~ 20% の濃度勾配のポリアクリルア  
ミドゲル (第一化学薬品社製) を用いた。ポリペプチドの染

色は、1%のクマシーブルー(CBB)で行った。その結果を、第15図に示した。第15図において、レーンMは分子量マーカー(プレスティンドプロテインマーカーブロードレンジ(NEW ENGLAND BIO Labs社製))、レーン1はnative hMBP、レーン2はrhMBP(ビタミンC添加培養)、およびレーン3はrhMBP(ビタミンC無添加培養)を示す。

第15図の結果から、還元条件下でのSDS-PAGEではnative hMBPと同じ分子量の位置にバンドを形成したが、非還元条件下でのSDS-PAGEとnative PAGEではnative hMBPと異なるパターンのバンドが形成されていた。

### (3) 精製rhMBPのゲル濾過クロマトグラフィー分析

精製したrhMBPを、20mM Tris-HCl (pH 8.0)、0.15 NaCl、5 mM EDTAを用い、流速0.5ml/分で、スーパーコース6 HR10/30 ( $\phi$  10mm×長さ300mm; ファルマシア社製)によりゲル濾過を行った。40  $\mu$ gのrhMBPをこのカラムに流し、280nmの吸光度で測定した。

カラムの検量には、バイオラッド社製ゲル濾過スタンダード(チログロブリン(670kDa)、ウシγグロブリン(158kDa)、チキン卵白アルブミン(44kDa)、ウシミオグロブリン(17kDa))を用いた。第16図に示すように、rhMBPでは300kDa、一方、native hMBPでは1,300kDaの付近に主要なピークを確認した。

### 実施例5 : rhMBPとnative hMBPの糖結合活性と糖特異性

マイクロタイタープレートを、マンナン(10  $\mu$ g/ml:SIGMA社製)を含む100  $\mu$ lのコーティング緩衝液(炭酸ナトリウム15 mM、炭酸水素ナトリウム35mM、0.05%アジ化ナトリウム、pH 9.6)中にて、4℃で、1晩表面処理した。各段階後にプレートをTBSNTC液(TBS、0.05%アジ化ナトリウム、0.05%ツイーン

20（登録商標）、5 mM塩化カルシウム）で3回洗浄した。コーティングが完了した後、プレートを、BlockAce（大日本製薬社製）で、室温で1時間処理し、ブロッキングを行った。

洗浄液、native hMBP、rhMBP（ビタミンC添加培養）、rhMBP  
5（ビタミンC無添加培養）を、200、100、50、25、12.5、6.25  
ng/mlの濃度に段階希釈したもの、および各hMBPの200ng/mlの  
濃度のものにEDTAを10mMとなるように添加したもの、さらに50  
ng/mlの濃度のものにマンノースを100mMとなるように添加した  
ものを準備し、各ウェルに100  $\mu$  lずつ加え、37°Cで1時間イン  
10 キュベートした。洗浄後、TBSNTCで1,000倍に希釈したビオ  
チン化抗ウサギ抗hMBP抗体（ビオチン化はEZ-Link（登録商標）  
Sulfo-NHS-LC-Biotin（PIACE社製）により行った）を加え、37  
°Cで1時間インキュベートした後、洗浄を行った。次に、  
VECTASTAIN ABC-AP STANDARDKIT（VECTOR社製）により、アピ  
15 ジンとビオチン化アルカリフォスファターゼの複合体を、37°C  
で30分間かけて形成させ、これを洗浄した。最後に、TMB基  
質液（KPL社製TMB マイクロウェル・ペルオキシダーゼ基質シス  
テム）100  $\mu$  lを各ウェルに加えた。室温で30分間インキュベ  
ートした後、1 Mリン酸100  $\mu$  lを添加し、450nmでの吸光度を  
20 測定した（Model 450 Microplate Reader；バイオラッド社  
製）。そして、糖抑制試験はこのELISA系を用いて、Lu et  
al.,の方法（バイオケミカル・ジャーナル（Biochem. J.）、  
284巻、795-802頁、1992年）に従って実施した。

マイクロタイター・プレートを、マンナン（1  $\mu$  g/100  $\mu$  lウ  
25 ェル）でコートした後、100、50、25、12.5、6.3、3.1、1.6mM  
の終濃度の糖類と共存させたnative hMBPおよびrhMBP（ビタ  
ミンC添加培養あるいはビタミンC無添加培養のもの）を反応さ  
せた。抑制曲線と比較して、結合を50%抑制する糖濃度を

I<sub>50</sub>として算出した。このようにして得られた結果を、以下の表1に示した。

表 1

5

rhMBPおよびnative hMBPの糖特異性

10

		I <sub>50</sub> (mM) *		
	糖 類	native	rhMBP	rhMBP
		hMBP	(ビタミンC 添加培養)	(ビタミンC 無添加培養)
15	N-アセチル-D-グルコサミン	2.7	3.6	3.8
	L-フコース	4.2	4.4	8.7
	D-フコース	33.5	39.1	86.7
	D-マンノース	3.7	6.7	6.8
	マルトース	7.4	6.4	7.4
20	N-アセチル-D-マンノサミン	4.4	6.9	6.9
	グルコース	3.2	2.0	2.4
	ガラクトース	24.2	29.8	36.7
	N-アセチル-D-ガラクトサミン	> 100	> 100	> 100
	ラクトース	36.0	46.6	59.4

25

注 記 : \* : マンナンとの結合を50%抑制する糖濃度

表 1 の結果から明らかなように、rhMBPの糖特異性は、native hMBPとほぼ一致していた。また、第17図に示すように、rhMBPは、native hMBPと同様の糖結合活性を有していた。

## 5 実施例 6 : 赤血球凝集抑制 (HI) 試験

### (1) ウイルス

インフルエンザ A ウイルスの A/Ibaraki/1/90 (H3N2:インフルエンザウイルス A 香港型) を、赤血球凝集抑制 (HI) 試験に用いた。

- 10 ウイルスは標準的な方法で、発育鶏卵のCAM(卵しょうのう膜)を用いて40代継代培養したもので、使用時まで $-70^{\circ}\text{C}$ で保存した。ウイルス増殖用培地としては、3%組織培養用ビタミン、0.2%アルブミン、0.1%グルコース、および $0.2\text{ng/ml}$ のアセチレートトリプシンを含有するイーグルMEM培地(日水製薬社製)を用いた。

### (2) rhMBPの赤血球凝集抑制 (HI) 活性

- Okuno et al., の方法 (ジャーナル・オブ・クリニカル・ミクロバイオロジー (J. Clin. Microbiol.), 28巻、1308-1313頁、1990年) に従って赤血球凝集抑制 (HI) 活性を測定した。すな
- 20 わち、native hMBPおよびrhMBP(ビタミンC添加培養あるいはビタミンC無添加培養のもの)( $5\text{ }\mu\text{g/ml}$ ) を、 $25\text{ }\mu\text{l}$ のTBSCで96穴マイクロプレート上で2倍段階希釈した。 $16\text{HAU}$ (赤血球凝集単位)のウイルス液 $25\text{ }\mu\text{l}$ を各MBP段階希釈液に加えて、 $37^{\circ}\text{C}$ で60分間反応させた後、0.5%ニワトリ赤血球溶液 $50\text{ }\mu\text{l}$ を
- 25 加えた。 $4^{\circ}\text{C}$ で60分間インキュベートした後、ウイルス介在性のヒヨコ赤血球凝集に対するrhMBPの効果を観察した。その結果を、以下の表 2 および第18図に示す。

表 2

rhMBPおよびnative hMBPによる  
赤血球凝集抑制(HI)活性の最少タンパク質濃度(ng/ml)

5

HI活性の最少 タンパク質濃度(ng/ml)	
10	native hMBP 40
	hMBP(ビタミンC 添加培養) 80
	hMBP(ビタミンC 無添加培養) 80

- 15 表2と第18図の結果から、rhMBPの赤血球凝集抑制(HI)活性は、native hMBPと比較して遜色のない活性(値)を示していた。

#### 実施例7：中和活性試験

##### 20 (1) ウイルス

実施例6と同じく、インフルエンザAウイルスA/Ibaraki/1/90を用いた。

##### (2) 中和活性試験

Okuno et al., の方法 (ジャーナル・オブ・クリニカル・ミ  
 25 クロバイオロジー(J. Clin. Microbiol.), 28巻、1308-1313頁、  
 1990年) に従って中和活性試験を行った。 native hMBPおよ  
 びrhMBP (ビタミンC 添加培養あるいはビタミンC 無添加培養  
 したもの) をTBSCで2倍段階希釈し、50 Focus Forming Unit

(FFU)/25  $\mu$ lのウイルス液を等量加えて混合し、37℃で、60分間反応させた。この反応液50  $\mu$ lを10%ウシ胎児血清(GIBCO社製)を含むイーグルMEM培地で培養された Madin-Darby Canine Kidney (MDCK)細胞を単層培養した96穴マイクロプレート上に、各MBP希釈濃度について3ウェル接種した。35℃で60分間インキュベートした後、細胞を洗浄し、0.5%トリガカントガム(和光純薬社製)を含むインフルエンザウイルス増殖用培地を加えて、CO<sub>2</sub>インキュベーター中で24時間培養した。

培養後、細胞を洗浄し、そして、エタノールで固定した。

10 風乾した後、抗インフルエンザ高度免疫ウサギ血清、抗ウサギIgGヤギ血清(ICNファーマシューティカル社製)、ペルオキシダーゼ抗ペルオキシダーゼ(ウサギ)複合体(ICNファーマシューティカル社製)を、各々37℃で、30分間反応させた。PBSで洗浄した後、DAB溶液(SIGMA社製)を加えて、ウイルス感染  
15 フォーカスが赤褐色に染色されるまで反応させた。そして、水道水で洗浄し、風乾した後にウイルス感染フォーカスを計数した。

第19図に、native hMBP、rhMBP画分(ビタミンC添加培地で培養)、rhMBP画分(ビタミンC無添加培地で培養)、および  
20 これらに100mMのマンノースを添加した試験区での、インフルエンザAウイルスへの中和活性の比較結果を示した。また、中和価は、MBPを含まず、これに代えてTBSCのみをウイルス液と混合した場合を100%とし、FFUの減少率で示した。その結果、rhMBP(ビタミンC添加培養あるいはビタミンC無添加培  
25 養のものは、native hMBPとほぼ同様にインフルエンザウイルスに対して、中和活性を示し、マンノースの添加により抑制されたことが確認された。



(3) HIV-1、HBVおよびインフルエンザAウイルスへの結合活性

rhMBPのHIV-1、HBVおよびインフルエンザAウイルスへの結合活性を、以下に示すウイルス構成タンパク質を電気泳動した後、メンブレンに移し、そこにrhMBPを結合させ、標識した抗体で検出して決定した。

用いたウイルス構成タンパク質の電気泳動に要した量は、HIV-gp120 (HIV<sub>111B</sub>-gp120) (ADVANCED BIOTECHNOLOGIES INCORPORATED (ABI) 社製) 0.25  $\mu$ g、HIV-gp160 (HIV<sub>111B</sub>-gp160) (ABI社製) 0.25  $\mu$ g、HBS (Hepatitis B Surface Antigen (HBsAg) (ABI社製)、サブタイプad) 10  $\mu$ g、インフルエンザAウイルス (IAV; 財団法人阪大微生物病研究所より供与を受けた)、H1N1 Yamagata ビリオン 5  $\mu$ g、H3N2 Bejin ビリオン 5  $\mu$ gであった。

SDS-PAGEは、4～20%の濃度勾配のポリアクリルアミドゲルを用い、HIV-1、HBSは、還元条件下で電気泳動を行った。電気泳動を行った後、Immobilon-P<sup>sq</sup>トランスファーメンブレン (ミリポア社製) にセミドライエレクトロブロットバッファークット (Owl Scientific社製) を用い、Nova Blot (ファルマシア社製) でトランスファーを行った。トランスファーを行った後、BlockAce (大日本製薬社製) で、室温で、1時間ブロッキングを行った。TBSTC (0.05% ツイーン20 (登録商標)、5mM 塩化カルシウム、TBS) またはTBSTE (0.05% ツイーン20 (登録商標)、5mM EDTA、TBS) (rhMBPの糖認識領域へのカルシウムイオン ( $\text{Ca}^{2+}$ ) 依存的な結合を阻害するコントロール) で洗浄を、10分間、3回行い、rhMBPをTBSTCまたはTBSTEで、1.0  $\mu$ g/mlに希釈した溶液を、室温で、1時間反応させた。

改めて前記同様に、TBSTCまたはTBSTEで洗浄を行った後に、TBSTCで1000倍希釈した抗ヒトMBPポリクローナル抗体を加え、

室温で、1時間反応させた。TBSTCで洗浄した後、TBSTCで5,000倍に希釈した抗ウサギIgGアルカリホスファターゼ標識(ケミコンインターナショナル社製)を加え、室温で、30分間反応させた。TBSTCで洗浄した後、NBT/BCIP(GIBCO社製)を用いて発色を行った。

その結果を、第20図に示した。第20図の結果から明らかな通り、本発明のrhMBPは、HIV-1、HBVおよびインフルエンザAウイルスへのいずれに対しても結合性を有することが明らかとなった。

10

#### 実施例8：ウイルス増殖（感染拡大）阻止試験

##### (1) ウイルス

実施例6と同じく、インフルエンザAウイルスA/Ibaraki/1/90を用いた。

##### 15 (2) ウイルス増殖（感染拡大）阻止試験

24穴マイクロタイタープレート上で、10%ウシ胎児血清を含むイーグルMEM培地でMDCK細胞を単層培養し、1ウェル当たり30FFUとなるように、インフルエンザウイルスを接種した。

35℃で60分間インキュベートした後、細胞を洗浄し、1ウェル当たり1mlの0.5%トリガカントガムを含むインフルエンザウイルス増殖用培地を加えた。さらに、native hMBP、rhMBP(ビタミンC添加培養)、rhMBP(ビタミンC無添加培養)、ウシ血清アルブミンを1ウェル当たり0.5および1  $\mu$ g/mlとなるように添加し、3日間培養した。

25 細胞を洗浄した後、実施例7(2)の中和活性試験と同様にて操作し、PAP染色法にてウイルス感染フォーカスの総面積を求めた。その結果を、第21図に示す。なお、対照として、100mMマンノース共存下で培養したものをを用いた(第21図の右

欄)。第21図の結果から明らかなように、rhMBPは、濃度依存的にインフルエンザウイルスの感染フォーカスの面積を減少させ、ウイルス増殖阻止効果を呈した。

## 5 実施例 9 : rhMBPによる補体活性化試験

### (1) ウイルス

実施例 6 と同じく、インフルエンザ A ウイルスは、A/Ibaraki/1/90(H3N2)を用いた。

### (2) 感作ヒツジ赤血球の調製

- 10 ヒツジ赤血球（日本バイオテスト研究所製）をゼラチン-ペロナール緩衝液（1 × ペロナール（145mM塩化ナトリウム、15.6 mM 5,5-ジエチルバルビタール酸、9.09mM 5,5-ジエチルバルビタール酸ナトリウム）、1%ゼラチン、0.25mM CaCl<sub>2</sub>、0.82mM MgCl<sub>2</sub>）で洗浄後、1 × 10<sup>9</sup> 細胞/mlの濃度になるようにゼラチン-ペロナール緩衝液で希釈した。ヒツジ赤血球（1 × 10<sup>9</sup> 細胞/ml）10ml、塩化クロム（0.5mg/ml）5ml、マンナン（60 μg/ml）5mlを混合し、室温で、5 分間インキュベートした後、ゼラチン-ペロナール緩衝液で数回洗浄し、再び 1 × 10<sup>9</sup> 細胞/mlの濃度になるようにゼラチン-ペロナール緩衝液に懸濁したものを、感作ヒツジ赤血球とした。
- 15
- 20

### (3) 補体活性化試験

- native hMBPおよびrhMBP（ビタミンC添加培養あるいはビタミンC無添加培養したもの）各400 μlと感作ヒツジ赤血球100 μlを混合し、室温で、15分間インキュベートした（各レクチン濃度は、終濃度1、10、100および1000ng/試験管とした）。
- 25
- 遠心後、沈査を1.1mlペロナール緩衝液に懸濁した。モルモット補体（ICNファーマシューティカル社製：マンナンカラム処理により内在性MBPを除き、ゼラチン-ペロナール緩衝液

- で20倍希釈したもの) 400  $\mu$  lを加え、37℃で、60分間インキュベートした後、遠心上清の541nmでの吸光度を測定した。対照には、感作ヒツジ赤血球100  $\mu$  lに蒸留水1400  $\mu$  lを加えて完全溶血させたものを用いた。マンノースによる阻害実験は、
- 5 感作ヒツジ赤血球とhMBPを反応させるときに同時に加えた。

その結果を、第22図に示す。第22図の結果から、rhMBP(ビタミンC添加培養あるいはビタミンC無添加培養したもの)は、native hMBPとほぼ同様に濃度依存的に感作ヒツジ赤血球を溶血させた。

- 10 このことから、rhMBPが感作ヒツジ赤血球表面のマンナンに結合し、それに続く補体の活性化を引き起こすことが推測された。この活性は、マンノースの添加により抑制されていた。

#### 〔産業上の利用の可能性〕

- 15 このように、本発明によって、従来、生体から極めて低収率でしか取得できなかったMBPと同等の生理活性を呈する均質なrhMBPを、大量に生産する手段が実現されたのである。また、本発明のrhMBPが、native hMBPと同質の生理活性を維持していることから、医薬品への利用についてもおおいに期待できるな
- 20 ど、多様な効果を奏するのである。

## 請 求 の 範 囲

1. ゲル濾過クロマトグラフィーで処理した際の280nmでの吸光度が、1,000～1,300kDaの分子量にて特異的なピークを示すことを特徴とする組換えヒトマンナン結合タンパク質(rhMBP)。  
5
2. 前記分子量が、1,150kDaである請求の範囲第1項に記載の組換えヒトマンナン結合タンパク質(rhMBP)。
- 10 3. ゲル濾過クロマトグラフィーで処理した際の280nmでの吸光度が、200～400kDaの分子量にて特異的なピークを示すことを特徴とする組換えヒトマンナン結合タンパク質(rhMBP)。
4. 前記分子量が、300kDaである請求の範囲第3項に記載の組  
15 換えヒトマンナン結合タンパク質(rhMBP)。
5. ゲル濾過クロマトグラフィーで処理した際の280nmでの吸光度が、1,000～1,300kDaおよび200～400kDaの分子量にて特異的なピークを示すことを特徴とする組換えヒトマンナン結合タ  
20 ンパク質(rhMBP)。

6. 組換えヒトマンナン結合タンパク質(rhMBP)の製造方法であって、以下の工程、すなわち；
- (a) 天然型ヒトマンナン結合タンパク質(native hMBP)のcDNAの66bp～812bpに対応するcDNAを、プラスミドpNOW1に挿入して
- 5 発現ベクターpNOW1-hMBPを構築し、
- (b) 前記発現ベクターpNOW1-hMBPを、ジヒドロ葉酸還元酵素欠損(dhfr<sup>-</sup>)のチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞に導入して形質転換体を得、
- (c) 前記形質転換体をネオマイシンを含んだ培養培地にて培養
- 10 して、ネオマイシン耐性の細胞を取得し、
- (d) 前記ネオマイシン耐性細胞をメトトレキサート(MTX)を含んだ培養培地にて培養して、MTX耐性の細胞を取得し、および
- (e) 得られたMTX耐性細胞から組換えヒトマンナン結合タンパク質(rhMBP)を回収する、
- 15 工程を含むことを特徴とする組換えヒトマンナン結合タンパク質(rhMBP)の製造方法。

7. 前記組換えヒトマンナン結合タンパク質(rhMBP)が、ゲル濾過クロマトグラフィーで処理した際の280nmでの吸光度にて、
- 20 1,000～1,300kDaの分子量にて特異的なピークを示す請求の範囲第6項に記載の組換えヒトマンナン結合タンパク質(rhMBP)の製造方法。

8. 前記組換えヒトマンナン結合タンパク質(rhMBP)が、ゲル
- 25 濾過クロマトグラフィーで処理した際の280nmでの吸光度にて、200～400kDaの分子量にて特異的なピークを示す請求の範囲第6項に記載の組換えヒトマンナン結合タンパク質(rhMBP)の製造方法。

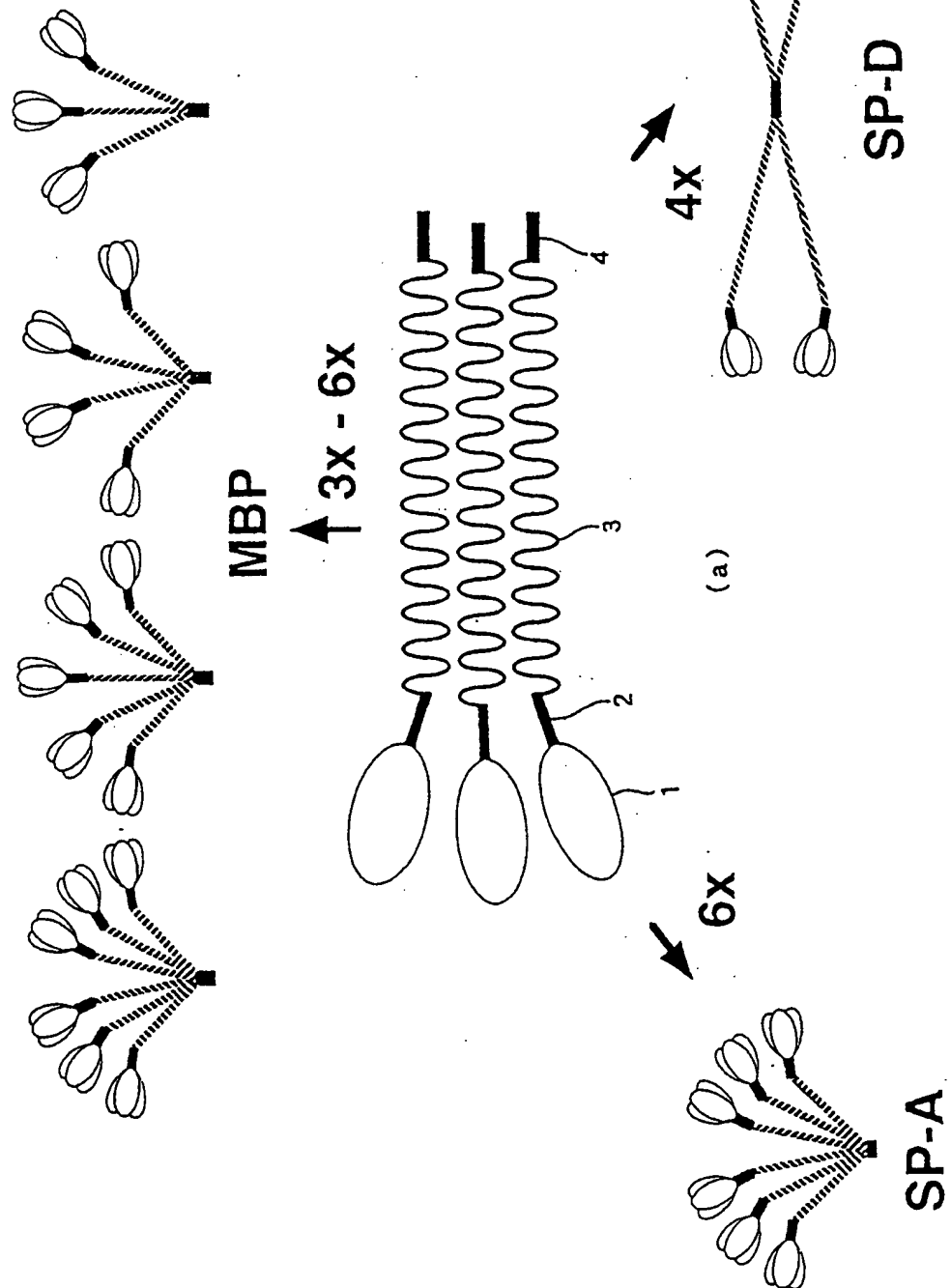
9. 前記組換えヒトマンナン結合タンパク質(rhMBP)が、ゲル濾過クロマトグラフィーで処理した際の280nmでの吸光度にて、1,000～1,300kDaおよび200～400kDaの分子量にて特異的なピークを示す請求の範囲第6項に記載の組換えヒトマンナン結合タンパク質(rhMBP)の製造方法。

10. 前記組換えヒトマンナン結合タンパク質(rhMBP)が、インフルエンザウイルスによる赤血球凝集の阻止活性を有する請求の範囲第6項乃至第9項のいずれかに記載の組換えヒトマンナン結合タンパク質(rhMBP)の製造方法。

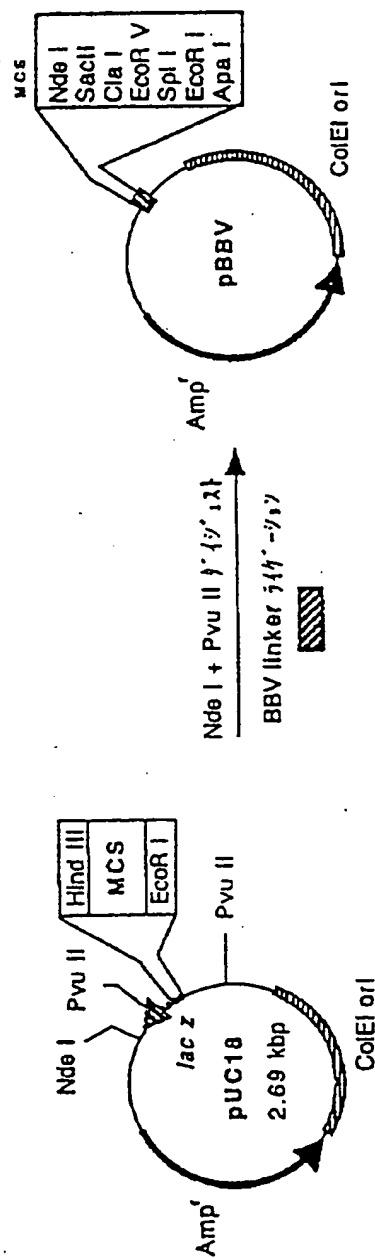
11. 請求の範囲第6項乃至第10項のいずれかに記載の方法によって製造されうる組換えヒトマンナン結合タンパク質(rhMBP)。



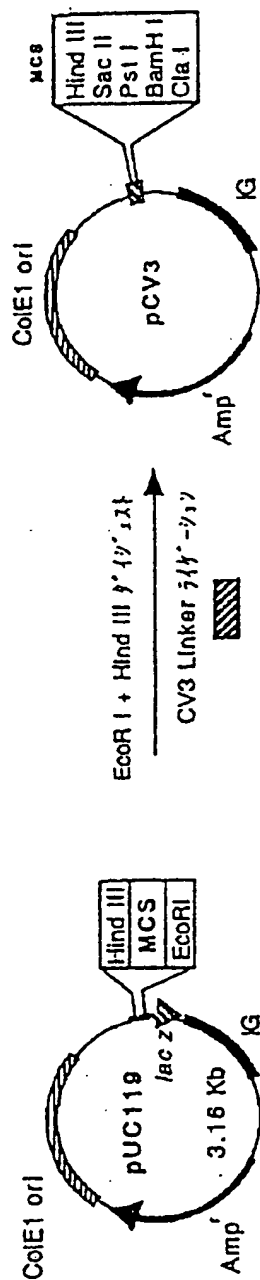




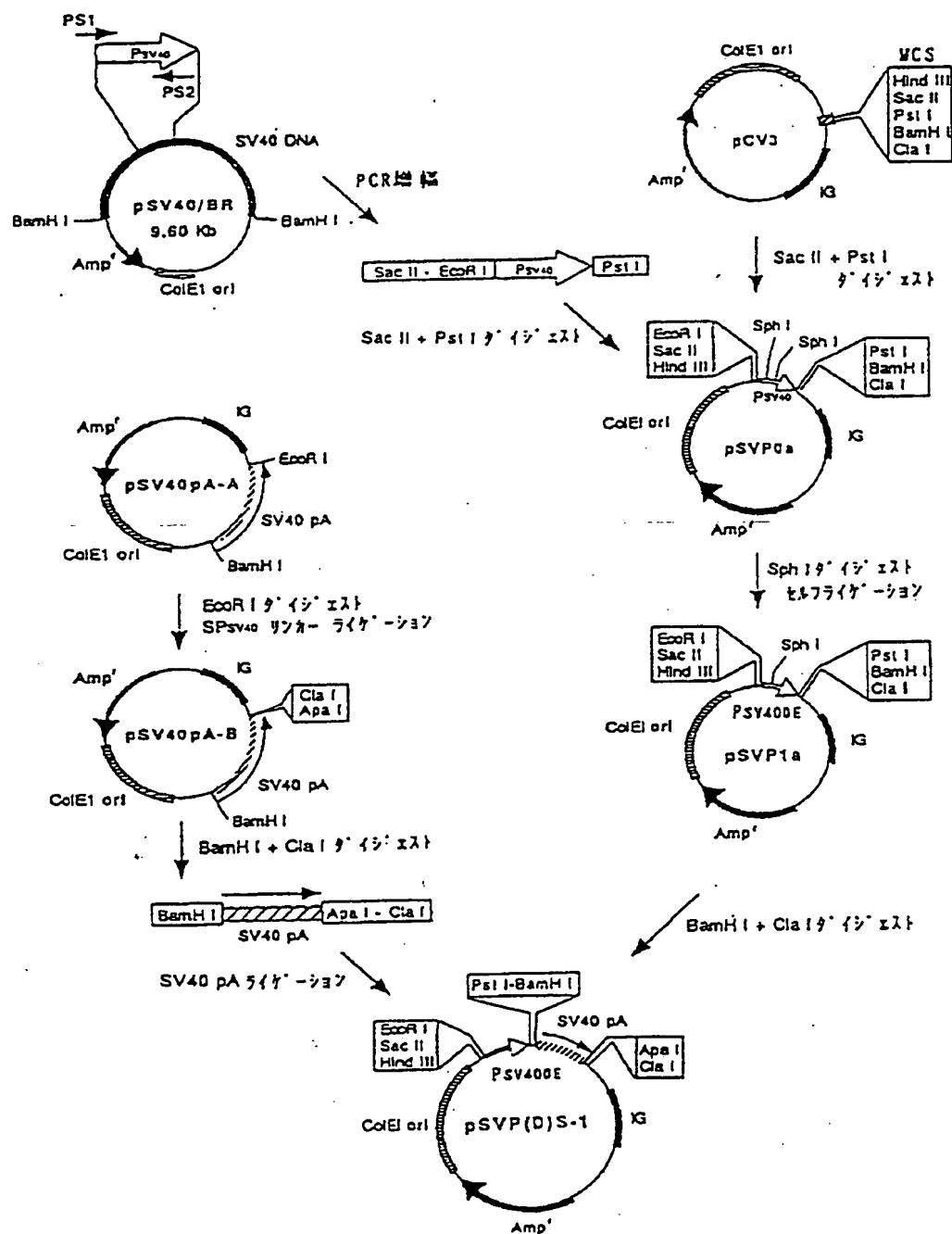


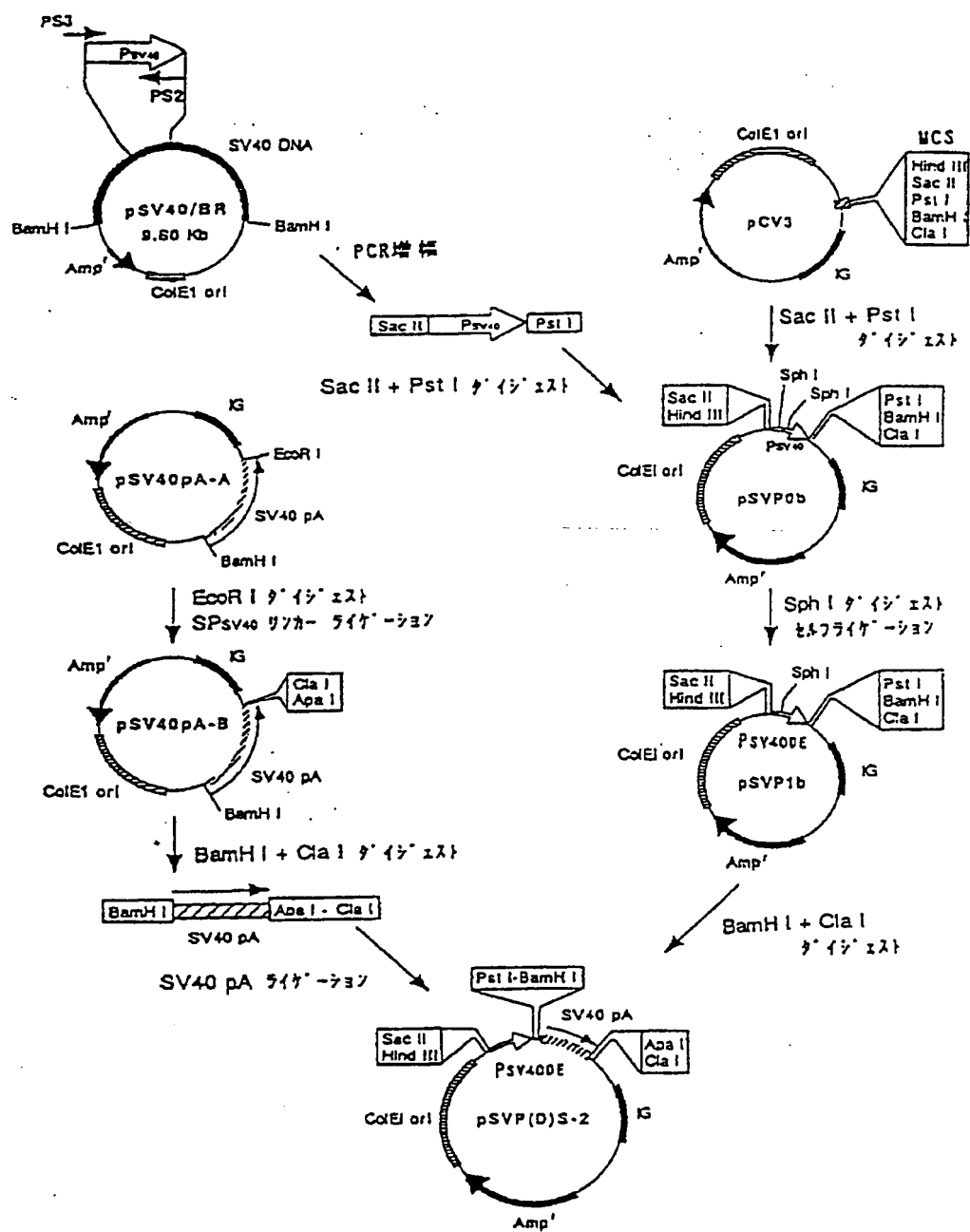




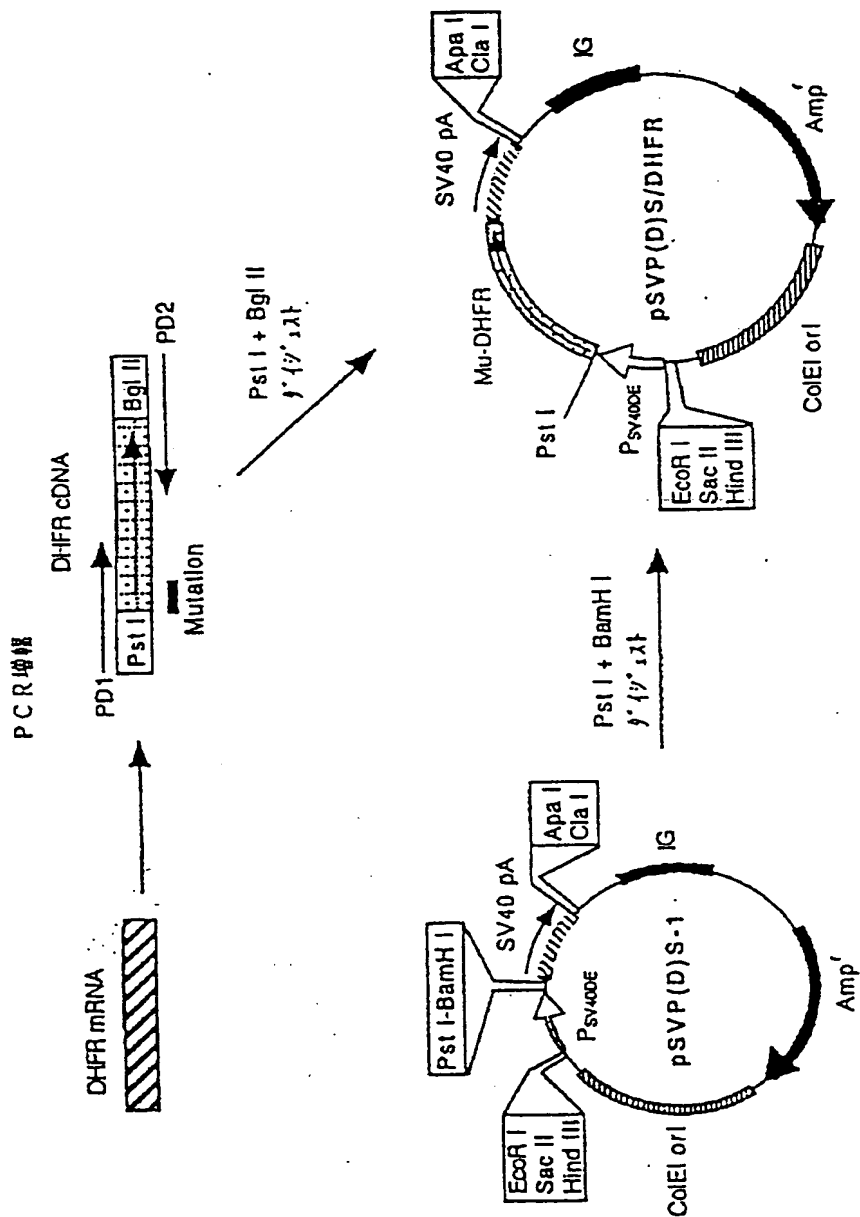


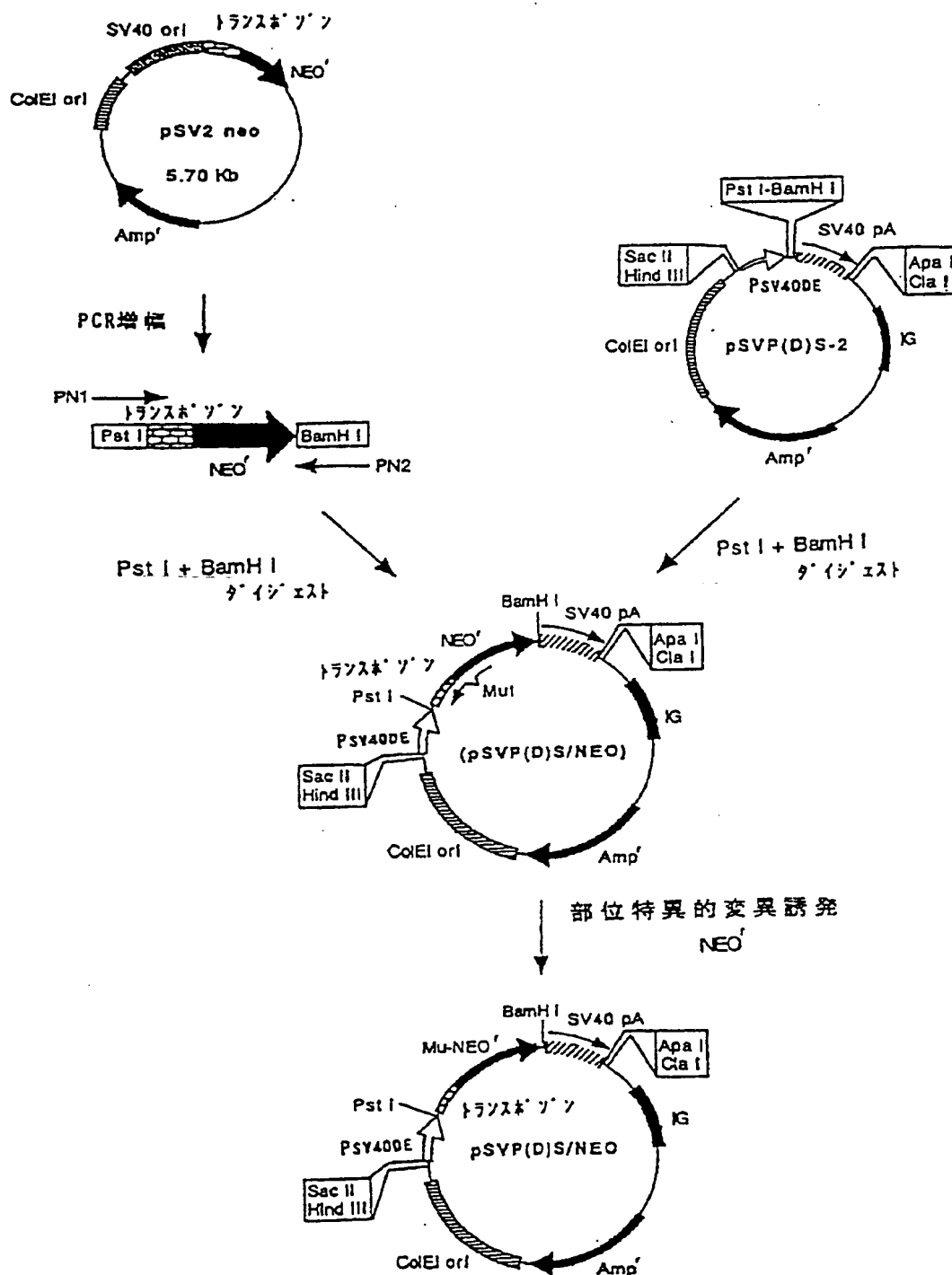
THIS 2125 BLANK (3370)

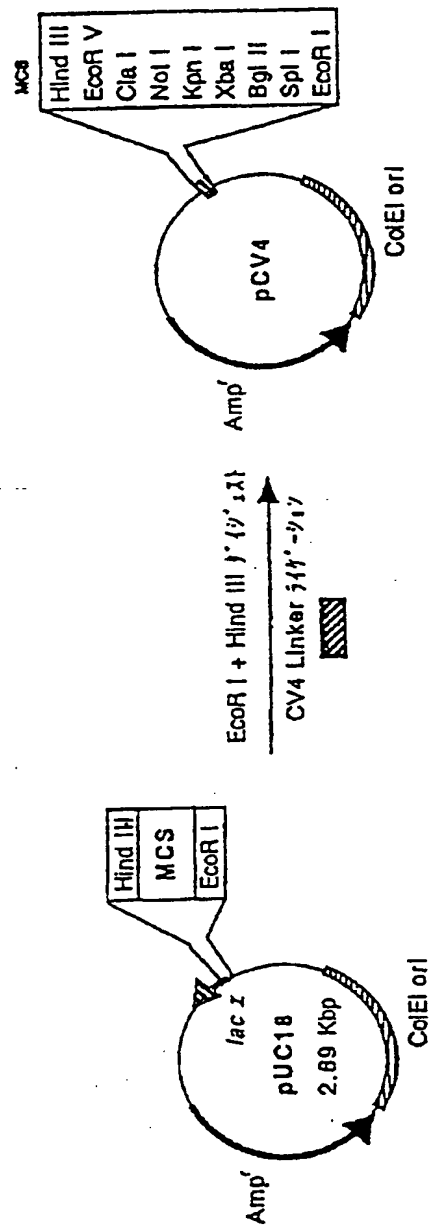


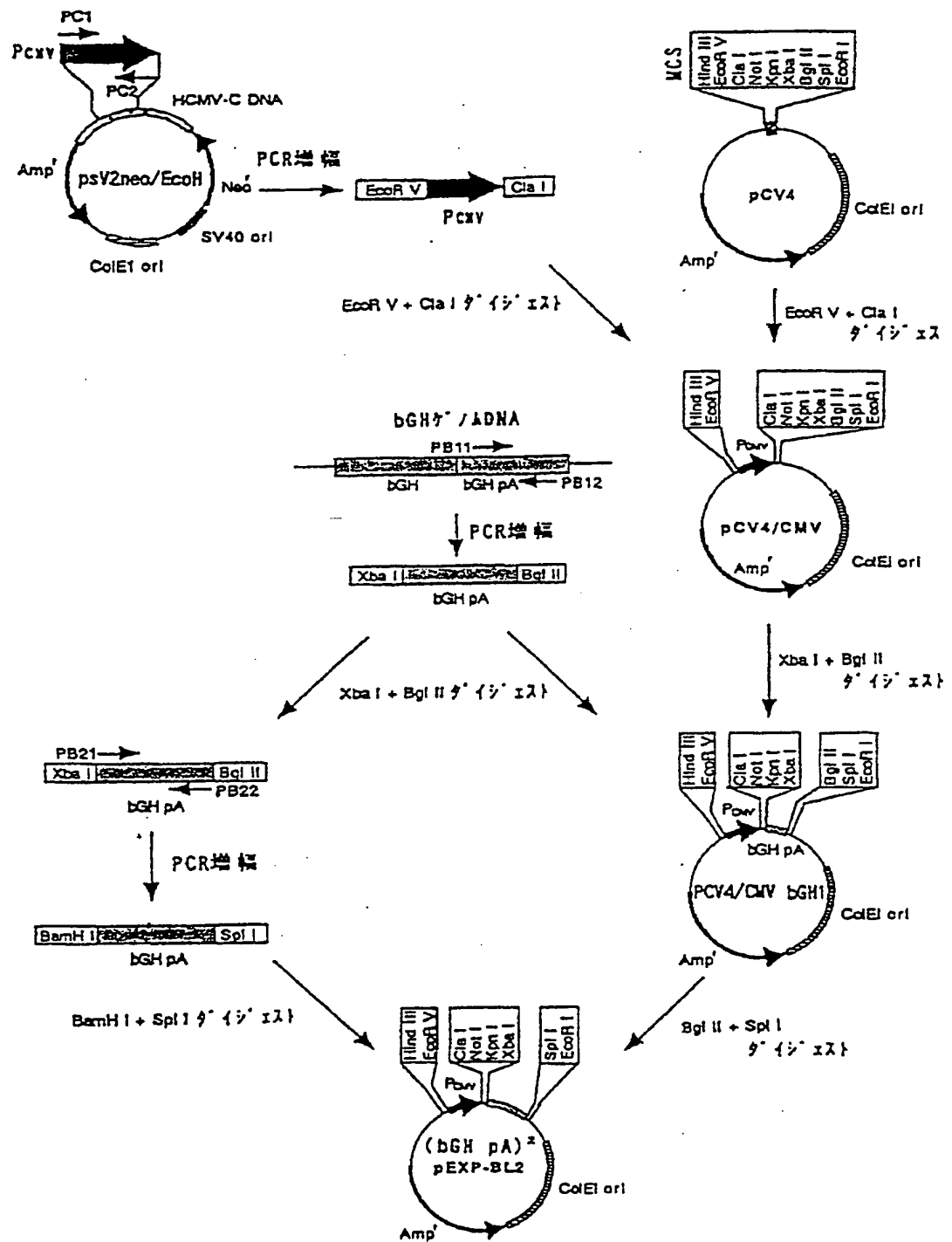


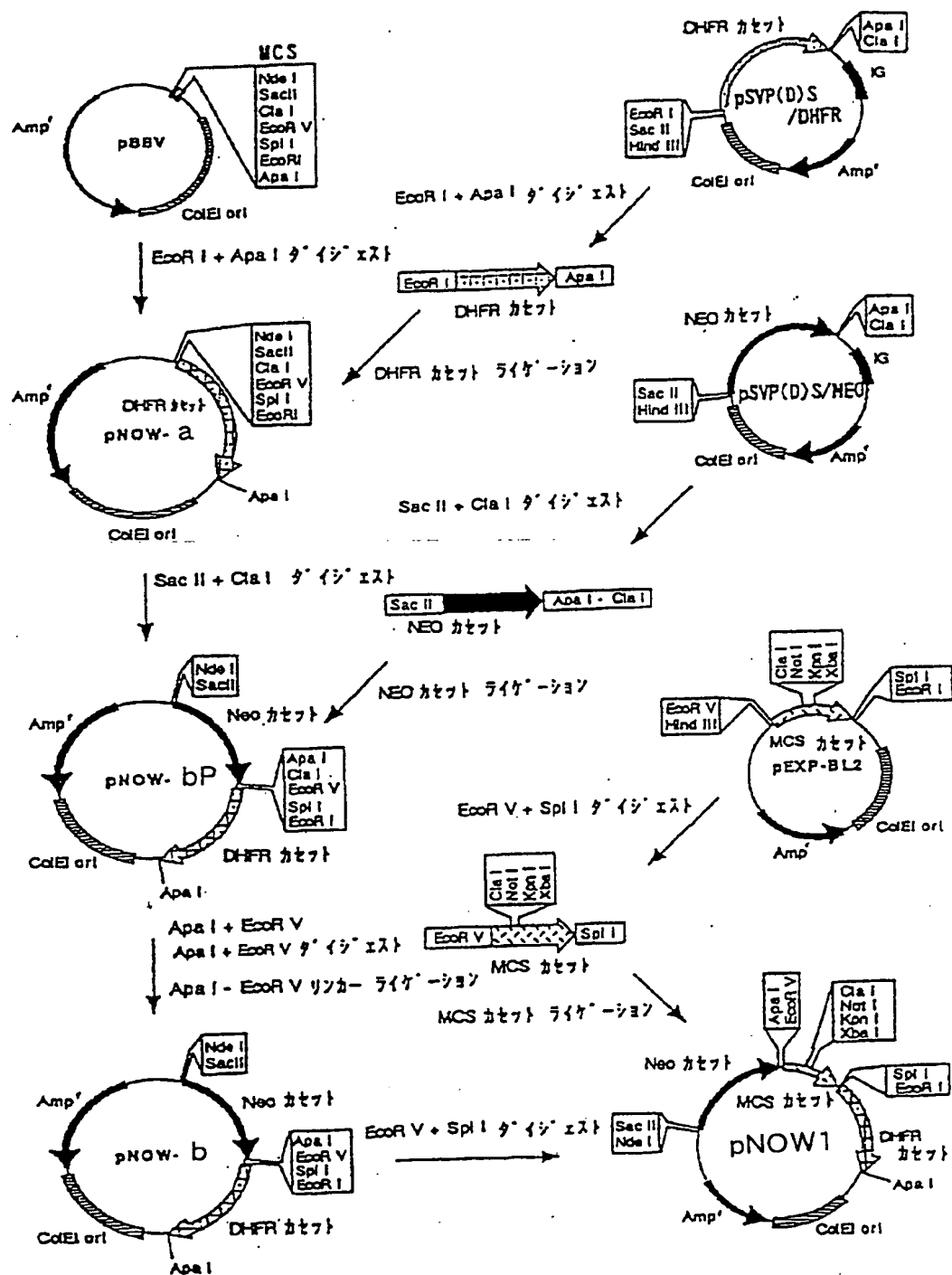


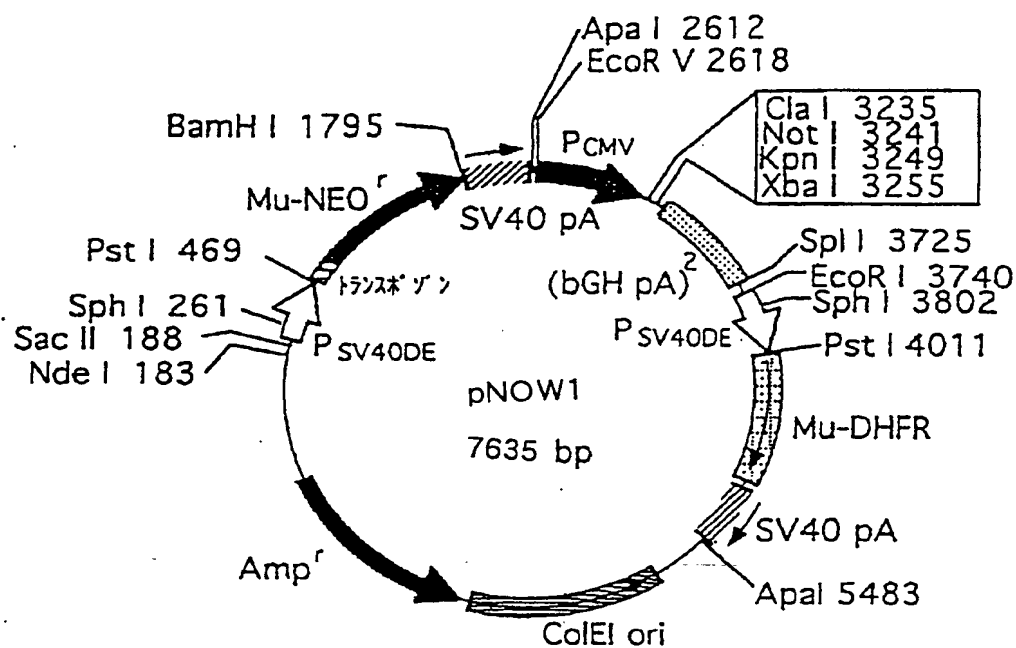




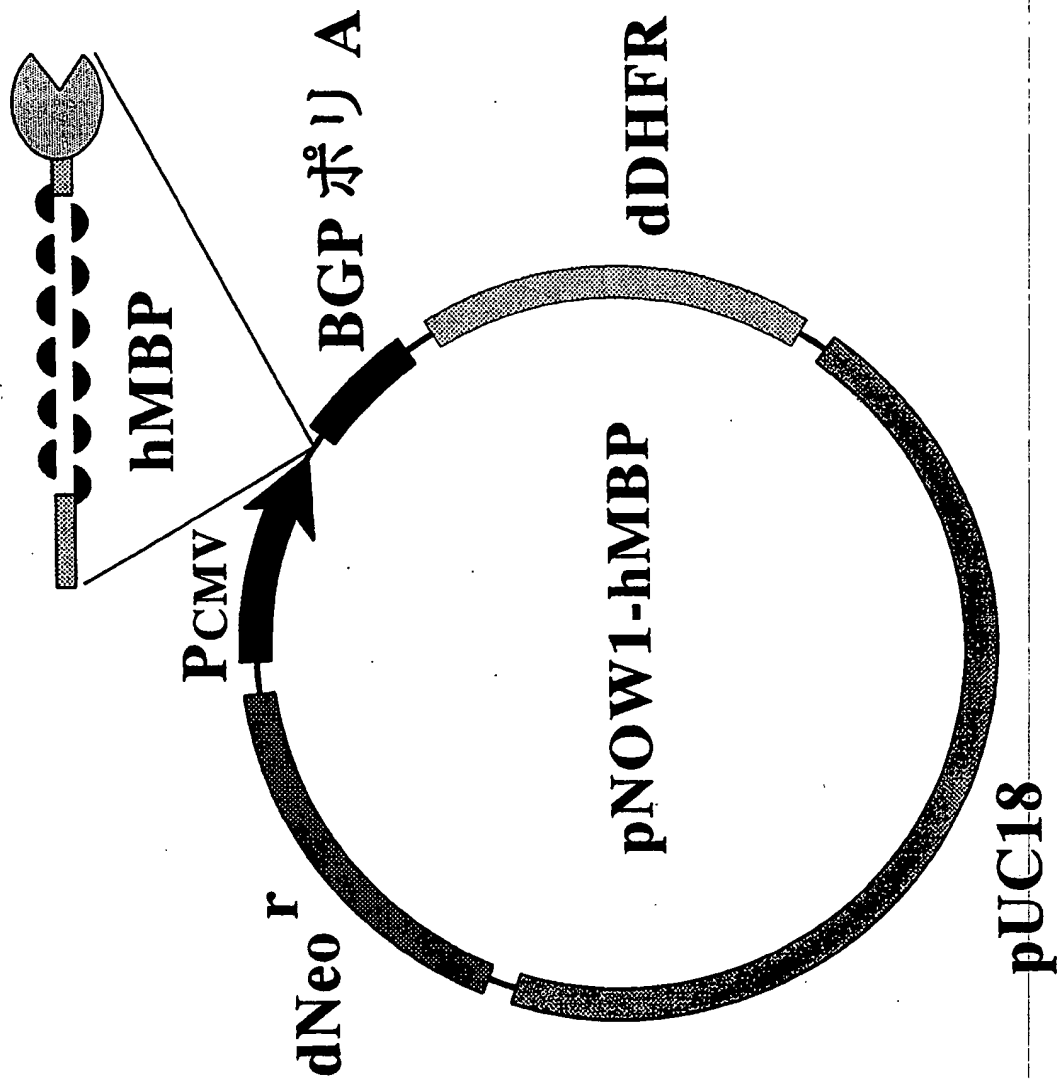






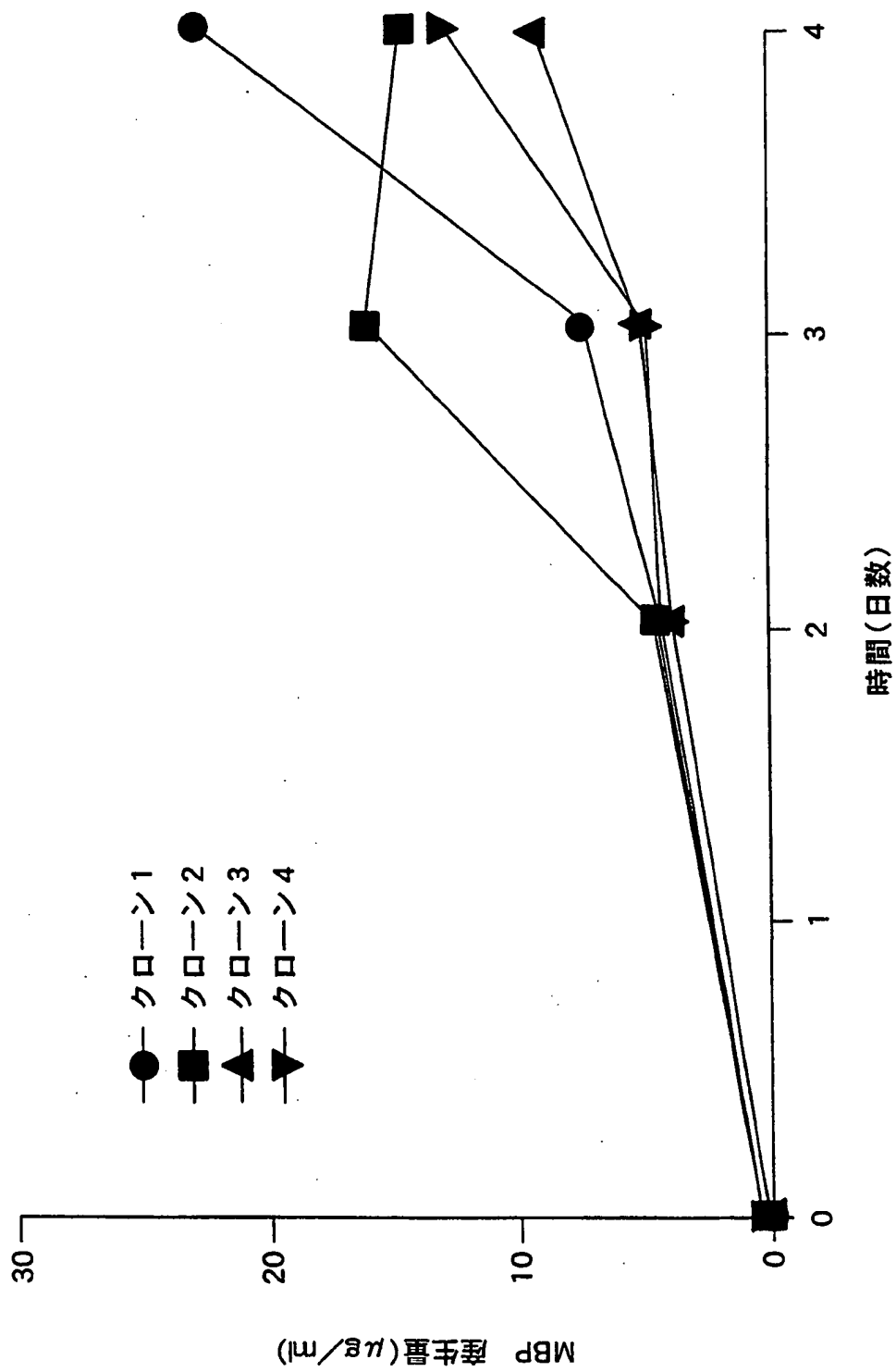


Amp <sup>r</sup>	アンピシリン耐性遺伝子
(bGH pA) <sup>2</sup>	ウシ成長ホルモンポリアダニレーションシグナル
ColEI ori	大腸菌複製オリジン
Mu-DHFR	変異導入されたDHFR遺伝子
Mu-NEO <sup>r</sup>	変異導入されたネオマイシン耐性遺伝子
PCMV	ヒトサイトメガロウイルス Major Immediate-Early 抗原プロモーター
P SV40DE	弱化SV40プロモーター (SV40複製オリジンを含む)
SV40 pA	SV40ポリアダニレーションシグナル
トランスポゾン	トランスポゾン配列

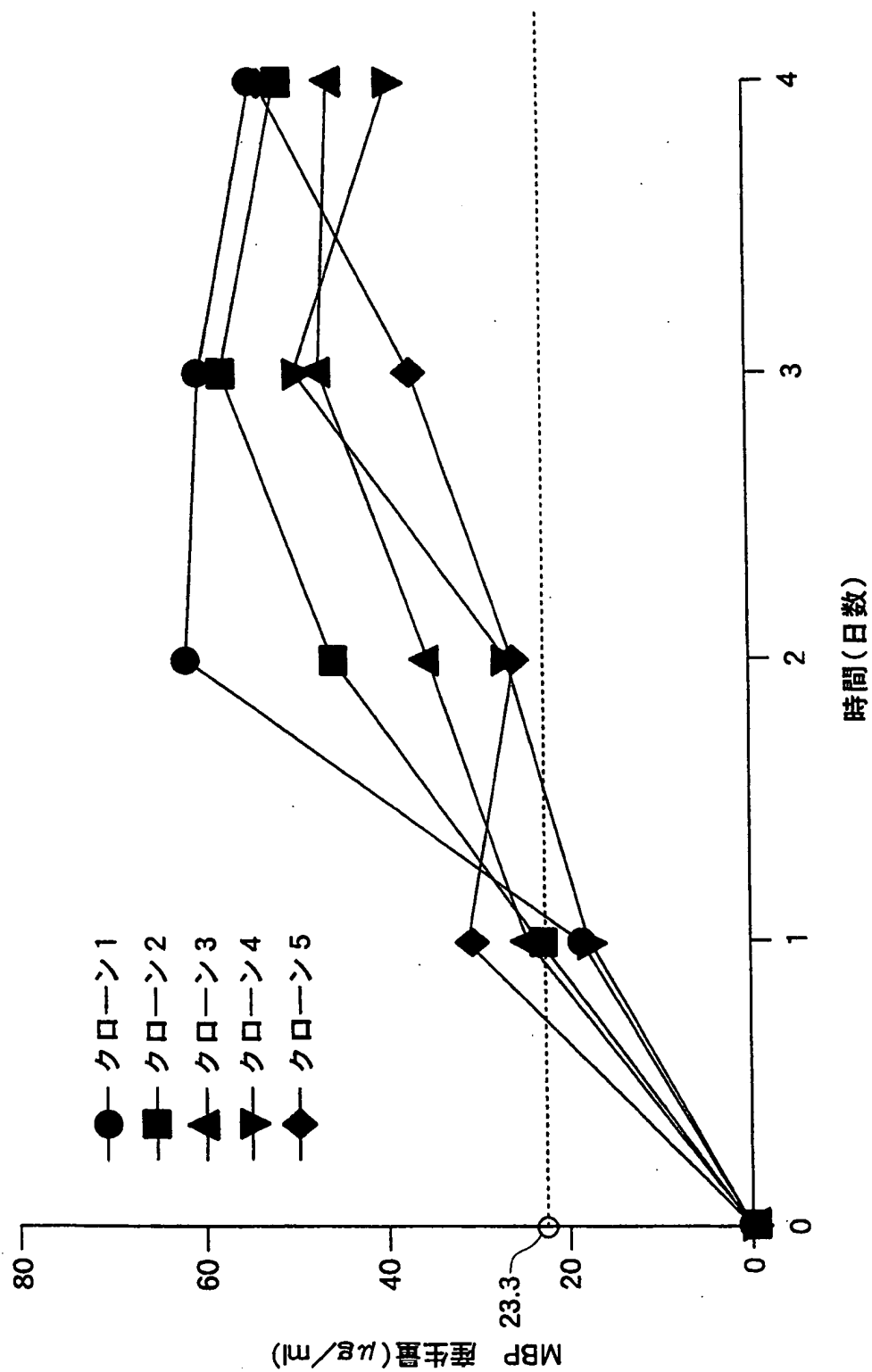


THIS PAGE BLANK





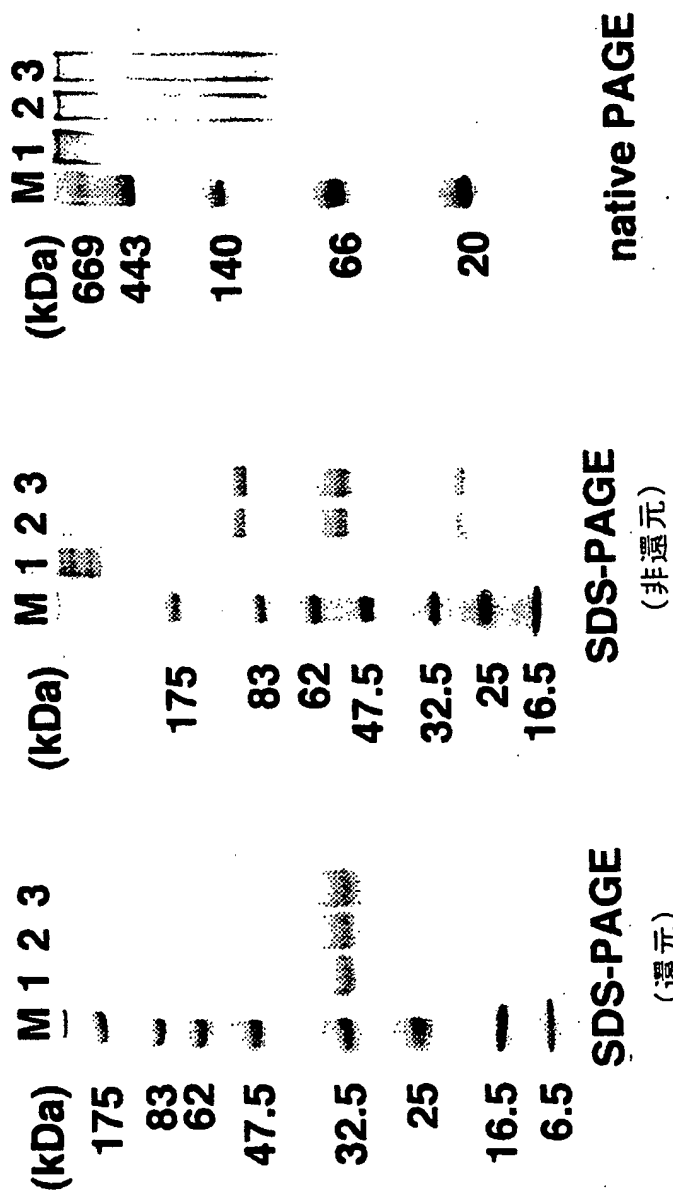




14/22

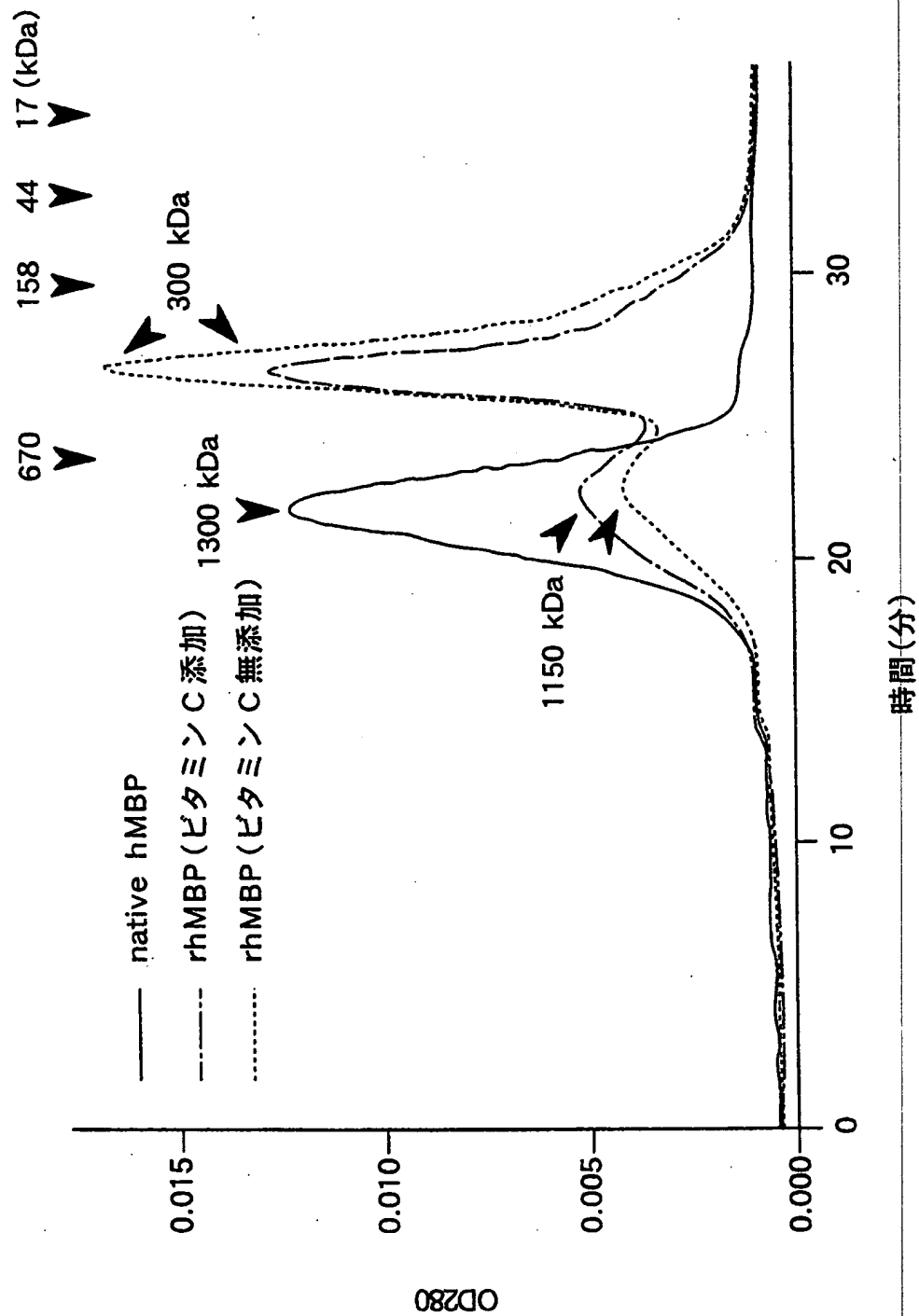
第14図

THIS PAGE BLANK (CONT)



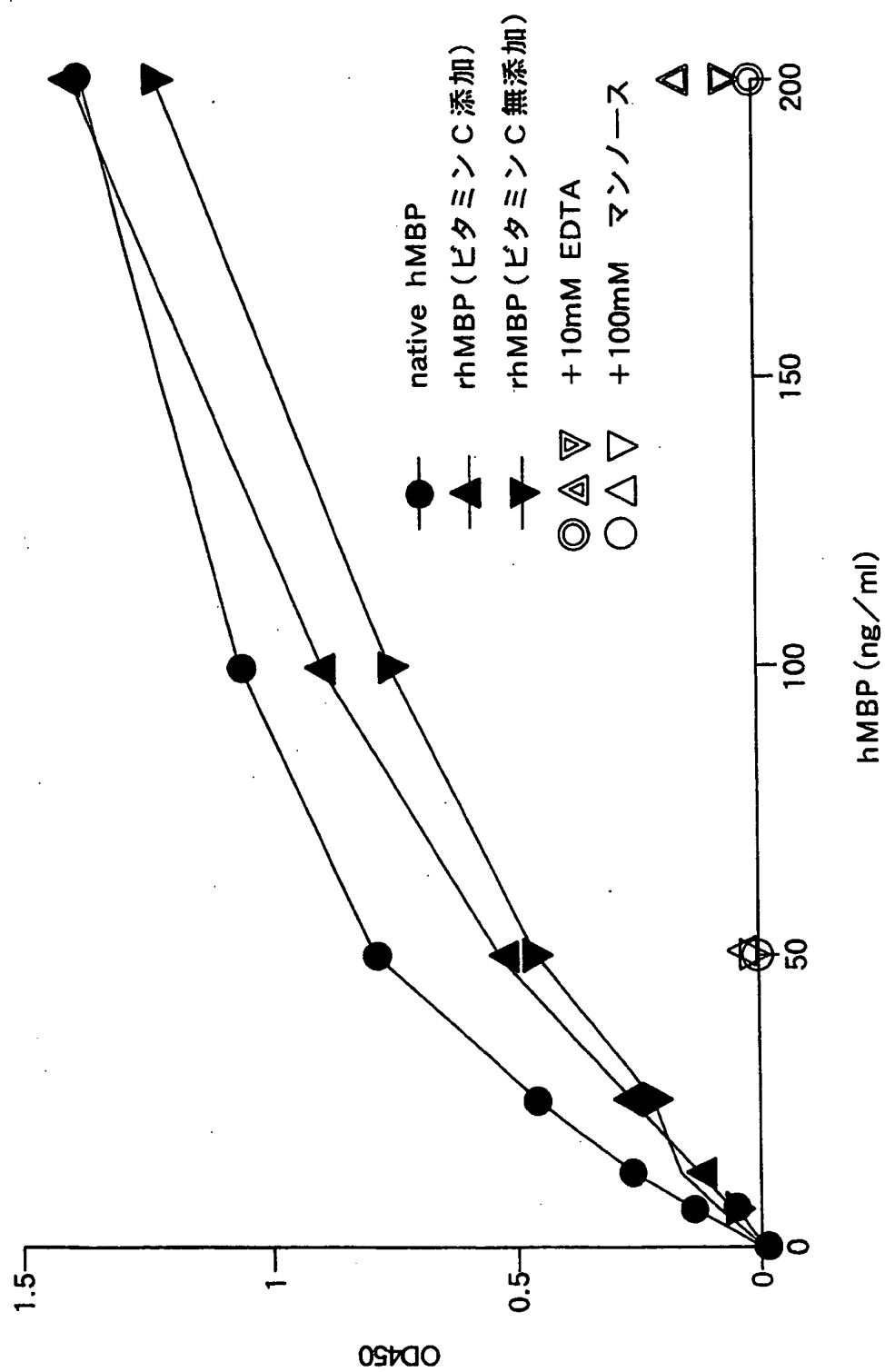
1. native hMBP
2. rhMBP (ビタミンC 添加)
3. rhMBP (ビタミンC 無添加)

THIS PAGE BLANK (C-1)

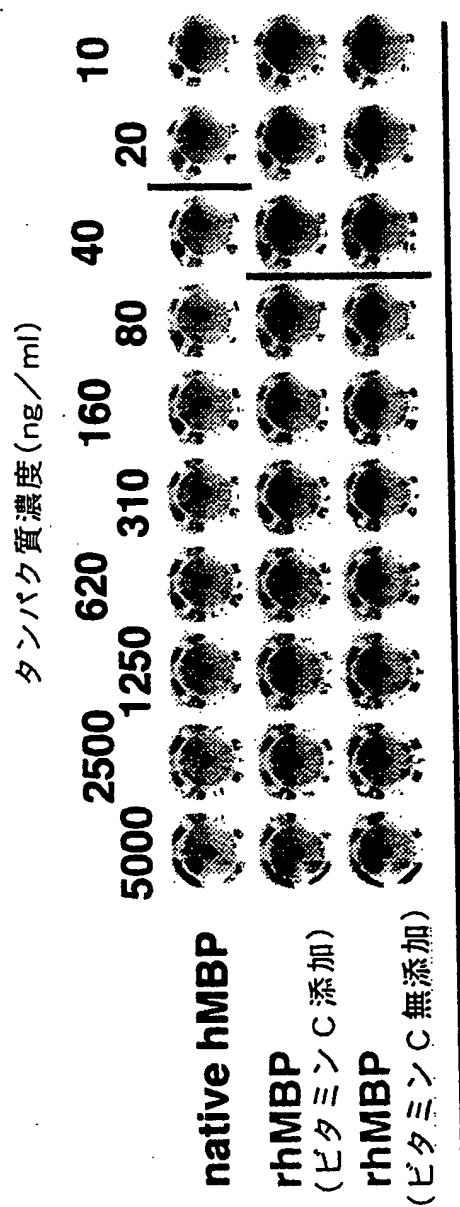




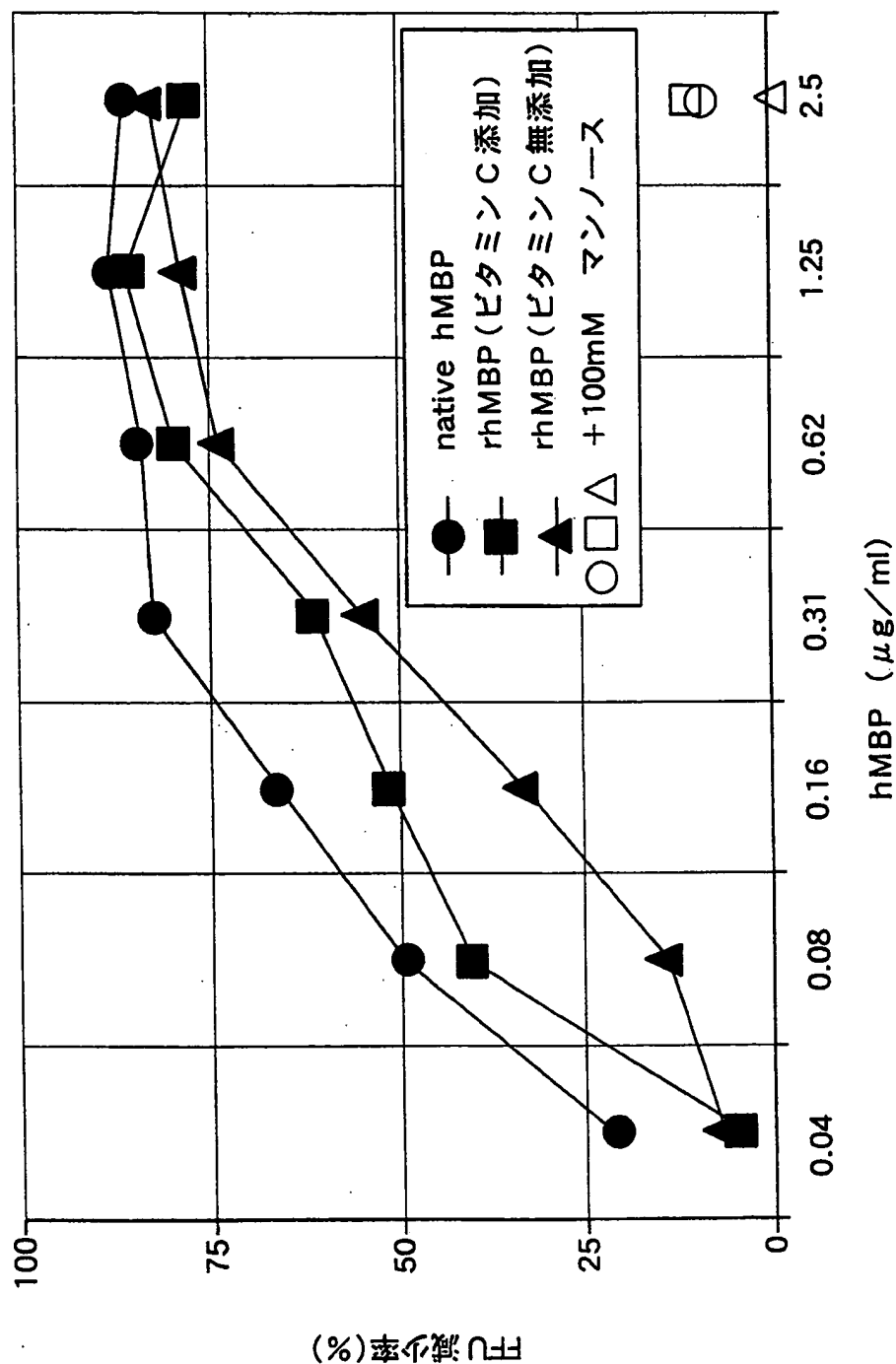




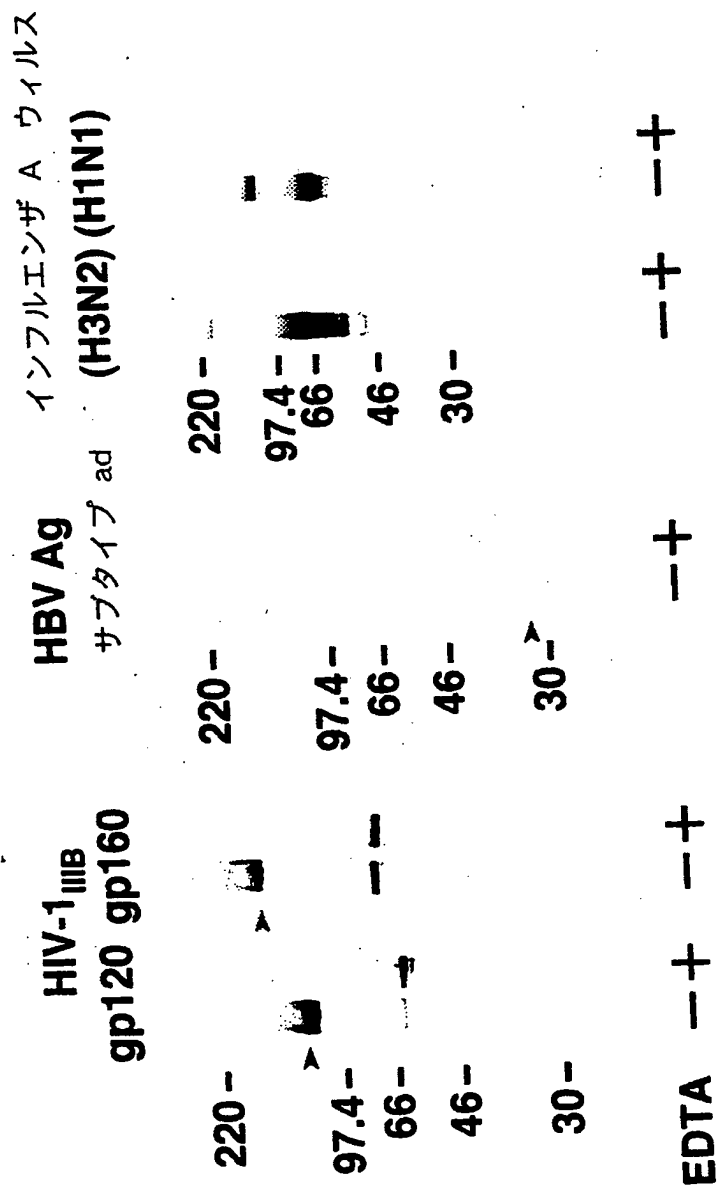
THIS PAGE BLANK (03/16)

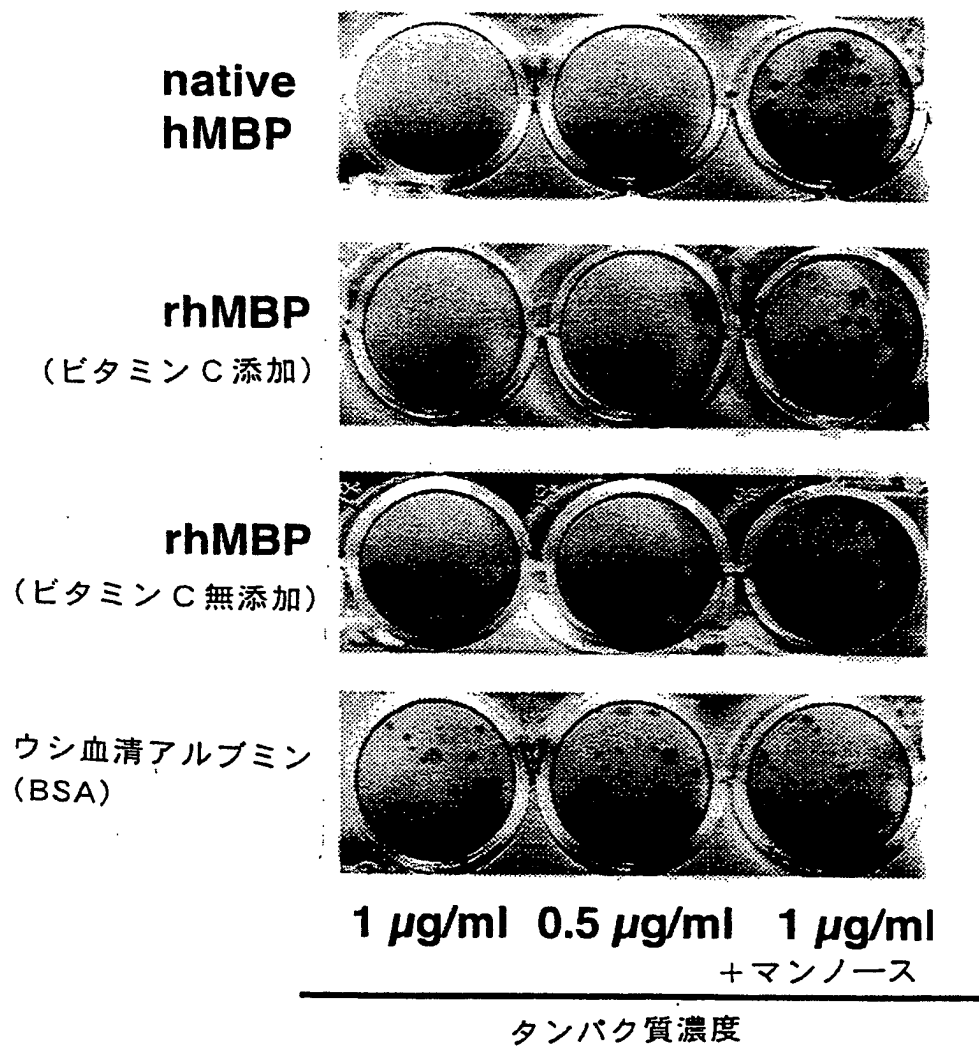


THIS PAGE BLANK (USPFO)

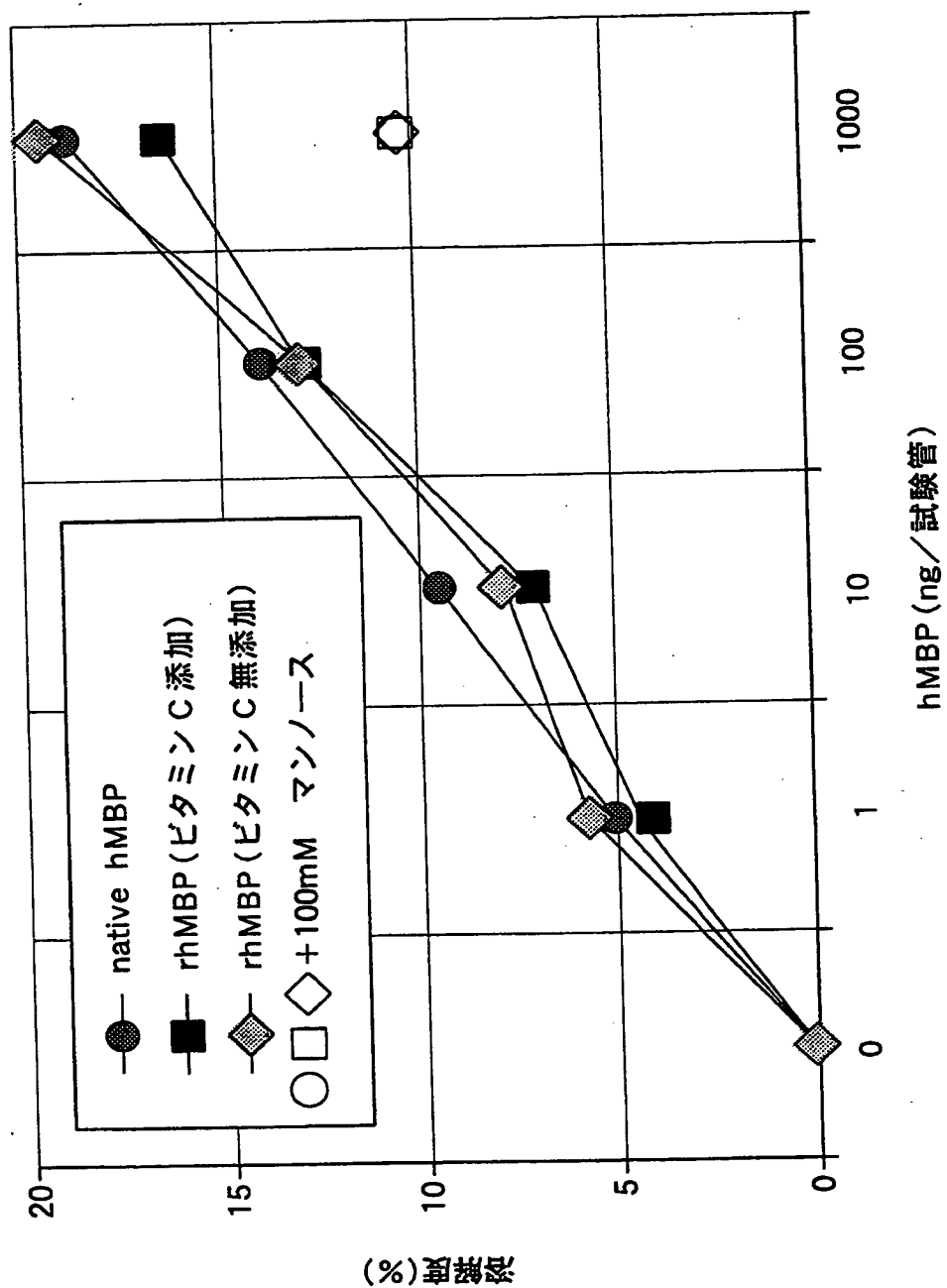


THIS PAGE BLANK (CSTC)









1.  
SEQUENCE LISTING

<110> Fuso Pharmaceutical Industries, Ltd.

<120> Recombinant Human Mannan Binding Protein and Producing Method  
Thereof

<130> 98P068W0

<150> JP 10-11864

<151> 1998-01-23

<160> 28

<210> 1

<211> 3605

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> sig peptide

<222> (66)... (125)

<220>

<221> CDS

<222> (66)... (812)

<400> 1

ggtaaataatg tgttcattaa ctgagattaa ccttcctga gttttctcac accaaggtga 60  
 ggacca tgt ccc tgt ttc cat cac tcc ctc tcc ttc tcc tga gta tgg tgg 111  
 Met Ser Leu Phe Pro Ser Leu Pro Leu Leu Leu Ser Met Val  
 -20 -15 -10  
 cag cgt ctt act cag aaa ctg tga cct gtg agg atg ccc aaa aga cct gcc 162  
 Ala Ala Ser Tyr Ser Glu Thr Val Thr Cys Glu Asp Ala Gln Lys Thr Cys  
 -5 1 5 10  
 ctg cag tga ttg cct gta gct ctc cag gca tca acg gct tcc cag gca aag 213  
 Pro Ala Val Ile Ala Cys Ser Ser Pro Gly Ile Asn Gly Phe Pro Gly Lys  
 15 20 25  
 atg ggc gtg atg gca cca agg gag aaa agg ggg aac cag gcc aag ggc tca 264  
 Asp Gly Arg Asp Gly Thr Lys Gly Glu Lys Gly Glu Pro Gly Gln Gly Leu  
 30 35 40 45  
 gag gct tac agg gcc ccc ctg gaa agt tgg ggc ctc cag gaa atc cag ggc 315  
 Arg Gly Leu Gln Gly Pro Pro Gly Lys Leu Gly Pro Pro Gly Asn Pro Gly  
 50 55 60  
 ctt ctg ggt cac cag gac caa agg gcc aaa aag gag acc ctg gaa aaa gtc 366  
 Pro Ser Gly Ser Pro Gly Pro Lys Gly Gln Lys Gly Asp Pro Gly Lys Ser  
 65 70 75 80  
 cgg atg gtg ata gta gcc tgg ctg cct cag aaa gaa aag ctc tgc aaa cag 417  
 Pro Asp Gly Asp Ser Ser Leu Ala Ala Ser Glu Arg Lys Ala Leu Gln Thr  
 85 90 95  
 aaa tgg cac gta tca aaa agt ggc tga cct tct ctc tgg gca aac aag ttg 468  
 Glu Met Ala Arg Ile Lys Lys Trp Leu Thr Phe Ser Leu Gly Lys Gln Val  
 100 105 110  
 gga aca agt tct tcc tga cca atg gtg aaa taa tga cct ttg aaa aag tga 519  
 Gly Asn Lys Phe Phe Leu Thr Asn Gly Glu Ile Met Thr Phe Glu Lys Val  
 115 120 125 130

agg cct tgt gtg tca agt tcc agg cct ctg tgg cca ccc cca gga atg ctg 570  
 Lys Ala Leu Cys Val Lys Phe Gln Ala Ser Val Ala Thr Pro Arg Asn Ala  
 135 140 145  
 cag aga atg gag cca ttc aga atc tca tca agg agg aag cct tcc tgg gca 621  
 Ala Glu Asn Gly Ala Ile Gln Asn Leu Ile Lys Glu Glu Ala Phe Leu Gly  
 150 155 160 165  
 tca ctg atg aga aga cag aag ggc agt ttg tgg atc tga cag gaa ata gac 672  
 Ile Thr Asp Glu Lys Thr Glu Gly Gln Phe Val Asp Leu Thr Gly Asn Arg  
 170 175 180  
 tga cct aca caa act gga acg agg gtg aac cca aca atg ctg gtt ctg atg 723  
 Leu Thr Tyr Thr Asn Trp Asn Glu Gly Glu Pro Asn Asn Ala Gly Ser Asp  
 185 190 195  
 aag att gtg tat tgc tac tga aaa atg gcc agt gga atg acg tcc cct gct 774  
 Glu Asp Cys Val Leu Leu Leu Lys Asn Gly Gln Trp Asn Asp Val Pro Cys  
 200 205 210 215  
 cca cct ccc atc tgg ccg tct gtg agt tcc cta tct gaagggtcat 820  
 Ser Thr Ser His Leu Ala Val Cys Glu Phe Pro Ile  
 220 225  
 atcactcagg ccctccttgt ctttttactg caaccacag gccacagta tgcttgaaaa 880  
 gataaattat atcaatttcc tcatatccag tattgttctt tttgtgggca atcactaaaa 940  
 atgatcacta acagcaccaa caaagcaata atagtagtag tagtagttag cagcagcagt 1000  
 agtagtcatg ctaattatat aatattttta atatatacta tgaggcccta tcttttgcag 1060  
 cctacattaa ttatctagtt taattaatct gtaatgcttt cgatagtgtt aacttgctgc 1120  
 agtatgaaaa taagacggat ttatttttcc atttacaaca aacacctgtg ctctgttgag 1180  
 ccttcctttc tgtttgggta gagggctccc ctaatgacat caccacagtt taataccaca 1240  
 gctttttacc aagtttcagg tattaagaaa atctattttg taactttctc tatgaactct 1300  
 gttttctttc taatgagata ttaaaccatg taaagaacat aaataacaaa tctcaagcaa 1360  
 acagcttcac aaattctcac acacatacat acctatatac tcactttcta gattaagata 1420  
 tgggacattt ttgactccct agaagccccg ttataactcc tctagtact aactcctagg 1480  
 aaaatactat tctgacctcc atgactgcac agtaatttcg tctgtttata aacattgtat 1540

agttggaatc atattgtgtg taatgttgta tgtcttgctt actcagaatt aagtctgtga 1600  
gattcattca tgtcatgtgt acaaaagttt catccttttc attgccatgt agggttccct 1660  
tatattaata ttctcagtt catccattct attgttaata ggcacttaag tggttccaa 1720  
tttttgcca tgaggaagag aacccacgaa cattcctgga ctgtctttt ggtggacatg 1780  
gtgcactaat ttactacct atccaggagt ggaactggta gaggatgagg aaagcatgta 1840  
ttcagcttta gtagatatta ccagttttcc taagtgattg tatgaattta tgctcctacc 1900  
ggcaatgtgt ggcagtccta gatgctctat gtgcttgtaa aaagtcaatg ttttcagttc 1960  
tcttgatttt cattattcct gtggatgtaa agtgatattt ccccatgggt ttaatctgta 2020  
ttccccaac atgtaataag gttgaacact tttttatatg cttattgggc acttgggtat 2080  
cttcttctgt gaagtaccg ttacattttt tgtattttgt ttaaattagt tagccaatat 2140  
ttttcttact gatttttaag ttatttttac attctgaata tgtccttttt aatgtgtatt 2200  
acaaatattt tgctagtttt tgacttgctc ctaatgttga attttgatga acaaaatttc 2260  
ctaattttga gaaagtctta tttattcata tttctttca aaattagtgc ttttgtgtc 2320  
atgtttaaga aatttttgcc catcccaaaa tcataagata ttttcatga tttgaaacc 2380  
atgaagagat ttttcatgat tttgaaatca tgaagatatt tttccatttt tttctaatag 2440  
ttttattaat aaacattcta tctattcctg gtagaataga tatccactg agacagcact 2500  
atgtaggaaa gaccattttt cctccactga actagggtgg tgcatttttg taagttaggt 2560  
aactgtatgt gtgtgtgtct gttctgggc tgtctattct agtctatttg ttgatgcttg 2620  
tgtcaaacag tacactatct taattattgt acatttatag ttgtaactgt agtccagctt 2680  
tggtcttctt caagtcaaga tttccatata aatattagaa acagtttctc aatttctaca 2740  
aaatcctgat gaggtttcta ctgggaccac attgagtcta tcaatcaact tatgcagaac 2800  
tggaactta ctactgaatc tctaataat gttcatcatg tatcgcttca tttactagg 2860  
atttctctaa ctttaattgct atgttttgag atttttagtt taaaaacctt gtatatcttg 2920  
ttttggtggt tttagtgatt ttaataatat attttaaata tttttcttt tctattgttg 2980  
tacacagaaa tacagttaag ttttgtgtgt agtcttacga tgtttagtaa cctcaataag 3040  
tttatttctt aaatctagta attttagat tctctggat tttgtatatg catagtcatg 3100  
taagctgaaa atatggcaat acttgcttct tcccaattgc ttacctttt ttcttacctt 3160  
attgcaactg ttagcaacc caatacagag accaccagag caggtataga ctctgaaag 3220  
acaatataat gaagtgtcc agtcaggcct atctaaactg gattcacagc tctgtcactt 3280  
aattgctaca tgatctagag ccagttactt tgtgtttcag ccatgtattt gcagctgaga 3340

```

gaaaataatc attcttattt catgaaaatt gtggggatga tgaaataagt taacaccttt 3400
aaagtgtgta gtaaagtatc aggatactat attttaggtc ttaatacaca cagttatgcc 3460
gctagataca tgctttttta tgagataatg tgatattata cataacacat atcgattttt 3520
aaaaattaaa tcaaccttgc tttgatggaa taaactccat ttagtcacaa aaaaaaaaaa 3580
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa 3605

```

<210> 2

<211> 747

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

```

atgtccctgt ttccatcact ccctctcctt ctcttgagta tggcgcagc gtcttactca 60
gaaactgtga cctgtgagga tgcccaaaag acctgccctg cagtgattgc ctgtagctct 120
ccaggcatca acggcttccc aggcaaagat gggcgtgatg gcaccaaggg agaaaagggg 180
gaaccaggcc aagggtcag aggcttacag ggccccctg gaaagtggg gcctccagga 240
aatccagggc cttctgggtc accaggacca aagggccaaa aaggagacc tggaaaaagt 300
ccggatgggtg atagtagcct ggctgcctca gaaagaaaag ctctgcaaac agaaatggca 360
cgtatcaaaa agtggctgac cttctctctg ggcaacaag ttgggaacaa gttcttcctg 420
accaatgggtg aaataatgac ctttgaaaa gtgaaggcct tgtgtgtcaa gttccaggcc 480
tctgtggcca cccccaggaa tgctgcagag aatggagcca ttcagaatct catcaaggag 540
gaagccttcc tgggcatcac tgatgagaag acagaagggc agtttgtgga tctgacagga 600
aatagactga cctacacaaa ctggaacgag ggtgaacca acaatgctgg ttctgatgaa 660
gattgtgtat tgctactgaa aaatggccag tggaatgacg tcccctgctc cacctcccat 720
ctggccgtct gtgagttccc tatctga 747

```

<210> 3

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

&lt;400&gt; 3

41

tatgccgcgg aatcgatgat taccgtacgg aattcgggcc c

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 39

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;400&gt; 4

39

acggcgcctt agctactaat ggcatgcctt aagcccggg

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 29

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;400&gt; 5

29

agcttcgcg gctgcaggga tccatcgat

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 29

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;400&gt; 6

29

aggcgccgac gtccctaggt agctattaa

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 7

ccccgcggga attctgtgga atgtgtgtca gttaggg

37

<210> 8

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 8

ccctgcagct ttttgcaaaa gcctaggcct cc

32

<210> 9

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 9

ccccgcggtg tggaatgtgt gtcagttagg g

31

<210> 10

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 10

aattgggccc atcgat

16



<210> 11

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 11

cccgggtagc tattaa

16

<210> 12

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 12

ggctgcagtc cctcatgctt cgaccattga actgcatcgt c

41

<210> 13

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 13

atagatctaa agccagcaaa agtcccatgg tc

32

<210> 14

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 14

ggctgcagct tcacgtgcc gcaagcac

28

<210> 15

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 15

ggggatccgg ggtgggcgaa gaactccag

29

<210> 16

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 16

atcttggtca agcatgcgaa acgacct

28

<210> 17

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 17

agcttgatat catcgatgcg gccgcggtac cagatctcgt acgtctagag

50

<210> 18

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 18

actatagtag ctacgccggc gccatggtct agagcatgca gatctcttaa

50

<210> 19

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 19

ccgattactt accgccatgt tgacattgat tattgactag ttattaa

47

<210> 20

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 20

ccatcgatcg gttcactaaa cgagctctgc ttatatagac ctccc

45

<210> 21

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 21

cctctagact gtgccttcta gttgccagcc at

32

<210> 22

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 22

ccagatctgt acccatagag cccaccgcat cc

32

<210> 23

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 23

ttggatccct gtgccttcta gttgccagcc at

32

<210> 24

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 24

ttcgtacgga tcccatagag cccaccgcat cc

32

<210> 25

<211> 7635

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

&lt;400&gt; 25

gcgcgttttcg gtgatgacgg tgaaaacctc tgacacatgc agctcccga gacggtcaca 60  
gcttgtctgt aagcggatgc cgggagcaga caagcccgtc agggcgcgtc agcgggtgtt 120  
ggcgggtgtc ggggctggct taactatgcg gcatcagagc agattgtact gagagtgcac 180  
catatgccgc ggtgtggaat gtgtgtcagt taggggtgtg aaagtcccca ggctcccag 240  
caggcagaag tatgcaaagc atgcatctca attagtcagc aaccatagtc ccgcccctaa 300  
ctccgcccac cccgccccta actccgccc gttccgccc ttctccgccc catggctgac 360  
taattttttt tatttatgca gaggccgagg cgctctgag ctattccaga agtagtgagg 420  
aggctttttt ggaggcctag gcttttgcaa aaaagctgca gtgggcttac atggcgatag 480  
ctagactggg cggttttatg gacagcaagc gaaccggaat tgccagctgg ggcgccctct 540  
ggtaaggttg ggaagccctg caaagtaaac tggatggctt tcttgccgc aaggatctga 600  
tggcgcaggg gatcaagatc tgatcaagag acaggatgag gatcgtttcg catgattgaa 660  
caagatggat tgcacgcagg ttctccgccc gcttgggttg agaggctatt cggtatgac 720  
tgggcacaaac agacaatcgg ctgctctgat gccgccgtgt tccggctgtc agcgcagggg 780  
cgcccggctt tttttgtcaa gaccgacctg tccgggtccc tgaatgaact gcaggacgag 840  
gcagcgcggc tatcgtggct ggccacgacg ggcgttcctt gcgcagctgt gctcgacgtt 900  
gtcactgaag cgggaaggga ctggctgcta ttgggcgaag tgccggggca ggatctcctg 960  
tcactcacc ttgctcctgc cgagaaagta tccatcatgg ctgatgcaat gcggcggctg 1020  
catacgcttg atccggtac ctgcccattc gaccaccaag cgaaacatcg catcgagcga 1080  
gcacgtactc ggatggaagc cggctctgtc gatcaggatg atctggacga agagcatcag 1140  
gggtcgcgc cagccgaact gttcgccagg ctcaaggcgc gcatgcccga cggcgaggat 1200  
ctcgtcgtga cccatggcga tgcctgcttg ccgaatatca tgggtggaaa tggccgcttt 1260  
tctggattca tcgactgtgg ccggctgggt gtggcggacc gctatcagga catagcgttg 1320  
gctaccctg atattgctga agagcttggc ggcgaaatgg ctgaccgctt cctcgtgctt 1380  
tacggtatcg ccgtcccga ttgcagcgc atcgcttct atcgcttct tgacgagttc 1440  
ttctgagcgg gactctgggg ttcgaaatga ccgaccaagc gacgccaac ctgccatcac 1500  
gagatttcga ttccaccgcc gccttctatg aaaggttggg cttcggaatc gttttccggg 1560  
acgccggctg gatgatcctc cagcgcggga tcacatgctg gattcttcgc ccacccctc 1620  
gatccctcg cgagttgggt cagctgctgc ctgaggctgg acgacctgc ggagttctac 1680  
cggcagtgca aatccgtcgg catccaggaa accagcagcg gctatccgc catccatgcc 1740

cccgaactgc aggagtgggg aggcacgatg gccgctttgg tcgacccgga cgggacgctc 1800  
ctgcgcctga tacagaacga attgcttgca ggcattctcat gagtgtgtct tcccgttttc 1860  
cgcttgaggt cactgcgtgg atgggatccg tgacataatt ggacaaacta cctacagaga 1920  
tttaaagctc taaggtaa ataaaaat ttaagtgtata atgtgttaaa ctactgattc 1980  
taattgtttg tgtatttttag attccaacct atggaactga tgaatgggag cagtgggtga 2040  
atgcctttta tgaggaaaac ctgttttgct cagaagaaat gccatctagt gatgatgagg 2100  
ctactgctga ctctcaacat tctactctc caaaaaagaa gagaaaggta gaagacccca 2160  
aggactttcc ttcagaattg ctaagttttt tgagtcatgc tgtgttttagt aatagaactc 2220  
ttgcttgctt tgctattttac accacaaagg aaaaagctgc actgctatac cagaaattat 2280  
gaaatattct gtaaccttta taagtaggca taacagttat aatcataaca tactgttttt 2340  
tcttactcca cacaggcata gagtgtctgc tattaataac tatgctcaaa aattgtgtac 2400  
ctttagcttt ttaatttgta aaggggttaa taaggaatat ttgatgtata gtgccttgac 2460  
tagagatcat aatcagccat accacatttg tagaggtttt acttgcttta aaaaacctcc 2520  
cacacctccc cctgaacctg aaacataaaa tgaatgcaat tgttgtgtt aacttgttta 2580  
ttgcagctta taatggttac aaataaagca atagcatcac aaatttcaca aataaagcat 2640  
ttttttcact gcattctagt tgtggtttgt ccaaactcat caatgtatct tatcatgtct 2700  
gggcccagata tccgatgtac gggccagata tacgcgttga cattgattat tgactagtta 2760  
ttaatagtaa tcaattacgg ggtcattagt tcatagccca tatatggagt tccgcgttac 2820  
ataacttacg gtaaattggc cgcctggctg accgccaac gacccccgc cattgacgtc 2880  
aataatgacg tatgttccca tagtaacgcc aatagggact ttccattgac gtcaatgggt 2940  
ggactattta cggtaaactg cccacttggc agtacatcaa gtgtatcata tgccaagtac 3000  
gccccctatt gacgtcaatg acggtaaag gcccgcctgg cattatgccc agtacatgac 3060  
cttatgggaa ctttctact tggcagtaca tctacgtatt agtcacgct attaccatgg 3120  
tgatgcggtt ttggcagtac atcaatgggc gtggatagcg gtttgactca cggggatttc 3180  
caagtctcca cccattgac gtcaatggga gtttgttttg gcacaaaat caacgggact 3240  
ttccaaaatg tcgtaacaac tccgccccat tgacgcaa atggcggtagg cgtgtacggt 3300  
gggaggtcta tataagcaga gcatcgatgc ggccgcggtta cctctagact gtgccttcta 3360  
gttgccagcc atctgttgtt tggccccccc tccccgtgc cttccttgac cctggaaggt 3420  
gccactccca ctgtcctttc ctaataaaat gaggaattg catcgattg tctgagtagg 3480  
tgtcattcta ttctgggggg tggggtgggg caggacagca agggggagga ttgggaagac 3540

aatagcaggc atgctgggga tgcggtgggc tctatggtct aggctgtgcc ttctagttgc 3600  
cagccatctg ttgtttggcc cccctcccc cgtgccttcc ttgaccctgg aaggtgccac 3660  
tcccactgtc ctttcctaataaaaatgagga aattgcatcg cattgtctga gtaggtgtca 3720  
ttctattctg gggggtgggg tggggcagga cagcaagggg gaggattggg aagacaatag 3780  
caggcatgct ggggatgcgg tgggctctat ggcgtagagg atgctagaga attctgtgga 3840  
atgtgtgtca gttagggtgt ggaaagtccc caggctcccc agcaggcaga agtatgcaaa 3900  
gcatgcatct caattagtca gcaaccatag tcccggccct aactccgccc atcccggccc 3960  
taactccgcc cagttccgcc cattctccgc cccatggctg actaatTTTT tttatttatg 4020  
cagaggccga ggcgctctg agctattcca gaagtagtga ggaggctttt ttggaggcct 4080  
aggcttttgc aaaaaagctg cagtccttca tggttcgacc attgaactgc atcgtcgccg 4140  
tgtcccaaaa tatggggatt ggcaagaacg gagacctacc ctggcctccg ctcaggaacg 4200  
agttcaagta cttccaaaga atgaccacaa cctcttcagt ggaaggtaaa cagaatctgg 4260  
tgattatggg taggaaaacc tggttctcca ttcctgagaa gaatcgacct ttaaaggaca 4320  
gaattaatat agttctcagt agagaactca aagaaccacc acgaggagct cttttcttg 4380  
ccaaaagttt ggatgatgcc ttaagactta ttgaacaacc ggaattgtca agtaaagtag 4440  
acatggtttg gatagtcgga ggagttctg tttaccagga agccatgaat caaccaggcc 4500  
acctcagact ctttgtgaca aggatcatgc aggaatttga aagtgcacg tttttccag 4560  
aaattgattt ggggaaatat aaacttctcc cagaataccc aggcgtcctc tctgaggctc 4620  
aggaggaaaa aggcataag tataagtttg aagtctacga gaagaaagac taacaggaag 4680  
atgctttcaa gttctctgct cccctcctaa agctatgcat tttataaga ccatgggact 4740  
tttgctggct ttaagatccg tgacataatt ggacaaacta cctacagaga tttaaagctc 4800  
taaggtaaat ataaaatttt taagtgtata atgtgttaaa ctactgattc taattgtttg 4860  
tgtattttag attccaacct atggaactga tgaatgggag cagtgggtgga atgcctttaa 4920  
tgaggaaaac ctgttttgct cagaagaaat gccatctagt gatgatgagg ctactgctga 4980  
ctctcaacat tctactcctc caaaaaagaa gagaaaggta gaagacccca aggactttcc 5040  
ttcagaattg ctaagttttt tgagtcatgc tgtgtttagt aatagaactc ttgcttgctt 5100  
tgctattttac accacaaagg aaaaagctgc actgctatac cagaaattat gaaatattct 5160  
gtaaccttta taagtaggca taacagttat aatcataaca tactgttttt tcttactcca 5220  
cacaggcata gagtgtctgc tattaataac tatgctcaaa aattgtgtac ctttagcttt 5280  
ttaatttgta aaggggttaa taaggaatat ttgatgtata gtgccttgac tagagatcat 5340

aatcagccat accacatttg tagaggtttt acttgcttta aaaaacctcc cacacctccc 5400  
cctgaacctg aaacataaaa tgaatgcaat tgttggtgtt aacttgctta ttgcagctta 5460  
taatggttac aaataaagca atagcatcac aaatttcaca aataaagcat ttttttact 5520  
gcattctagt tgtggtttgt ccaaactcat caatgtatct tatcatgtct gggccctgc 5580  
attaatgaat cgccaacgc gcggggagag gcggtttgcg tattgggcgc tcttcgctt 5640  
cctcgctcac tgactcgctg cgctcggtcg ttcggctgcg gcgagcggta tcagctcact 5700  
caaaggcgt aatacggta tccacagaat caggggataa cgcaggaaag aacatgtgag 5760  
caaaaggcca gcaaaaggcc aggaaccgta aaaaggccgc gttgctggcg tttttccata 5820  
ggctccgccc ccctgacgag catcacaaaa atcgacgctc aagtcagagg tggcgaaacc 5880  
cgacaggact ataaagatac caggcgtttc cccctggaag ctccctcgtg cgctctcctg 5940  
ttccgaccct gccgcttacc ggatacctgt ccgcctttct cccttcggga agcgtggcgc 6000  
tttctcaatg ctacgctgt aggtatctca gttcggtgta ggtcgctcgc tccaagctgg 6060  
gctgtgtgca cgaaccccc gttcagccc accgctgcgc cttatccggt aactatcgtc 6120  
ttgagtccaa cccggtgaaga cagacttat cgccactggc agcagccact ggtaacagga 6180  
ttagcagagc gaggtatgta ggcggtgcta cagagttctt gaagtgggtg cctaactacg 6240  
gtacactag aaggacagta tttggtatct gcgctctgct gaagccagtt accttcggaa 6300  
aaagagttgg tagctcttga tccggcaaac aaaccaccgc tggtagcggg ggtttttttg 6360  
tttgcaagca gcagattacg cgcagaaaaa aaggatctca agaagatcct ttgatctttt 6420  
ctacggggtc tgacgctcag tggaacgaaa actcacgta agggattttg gtcattgagat 6480  
tatcaaaaag gatcttcacc tagatccttt taaattaaaa atgaagtttt aaatcaatct 6540  
aaagtatata tgagtaaact tggcttgaca gttaccaatg cttaatcagt gaggcaccta 6600  
tctcagcgat ctgtctatct cgttcatcca tagttgcctg actccccgtc gtgtagataa 6660  
ctacgatacg ggagggtta ccatctggcc ccagtgtgc aatgataccg cgagaccac 6720  
gtcaccggc tccagattta tcagcaataa accagccagc cggaagggcc gagcgagaa 6780  
gtggtcctgc aactttatcc gcctccatcc agtctattaa ttgttgccgg gaagctagag 6840  
taagtagttc gccagttaat agtttgcca acgttggtgc cattgctaca ggcacgtg 6900  
tgtcacgctc gtcgtttggt atggcttcat tcagctccgg tcccaacga tcaaggcgag 6960  
ttacatgata ccccatgttg tgcaaaaaag cggttagctc cttcggtcct ccgatcgtg 7020  
tcagaagtaa gttggccgca gtgttatcac tcatggttat ggcagcactg cataattctc 7080  
ttactgtcat gccatccgta agatgctttt ctgtgactgg tgagtactca accaagtc 7140



16

tctgagaata gtgtatgcgg cgaccgagtt gctcttgccc ggcgtcaata cgggataata 7200  
ccgcgccaca tagcagaact ttaaaagtgc tcatcattgg aaaacgttct tcggggcgaa 7260  
aactctcaag gatcttaccg ctgttgagat ccagttcgat gtaaccact cgtgcacca 7320  
actgatcttc agcatctttt actttcacca gcgtttctgg gtgagcaaaa acaggaaggc 7380  
aaaatgccgc aaaaaaggga ataagggcga cacggaaatg ttgaatactc atactcttcc 7440  
tttttcaata ttattgaagc atttatcagg gttattgtct catgagcgga tacatatttg 7500  
aatgtattta gaaaaataaa caaatagggg ttccgcgcac atttccccga aaagtgccac 7560  
ctgacgtcta agaaaccatt attatcatga cattaaccta taaaaatagg cgtatcacga 7620  
ggccctttcg tcctc 7635

&lt;210&gt; 26

&lt;211&gt; 39

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;400&gt; 26

aaggaaaaaa gcggccgcat gtcctgttt ccatcactc

39

&lt;210&gt; 27

&lt;211&gt; 29

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;400&gt; 27

gctctagatc agataggga ctcacagac

29

&lt;210&gt; 28

&lt;211&gt; 248

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 28

Met Ser Leu Phe Pro Ser Leu Pro Leu Leu Leu Leu Ser Met Val Ala  
1 5 10 15  
Ala Ser Tyr Ser Glu Thr Val Thr Cys Glu Asp Ala Gln Lys Thr Cys  
20 25 30  
Pro Ala Val Ile Ala Cys Ser Ser Pro Gly Ile Asn Gly Phe Pro Gly  
35 40 45  
Lys Asp Gly Arg Asp Gly Thr Lys Gly Glu Lys Gly Glu Pro Gly Gln  
50 55 60  
Gly Leu Arg Gly Leu Gln Gly Pro Pro Gly Lys Leu Gly Pro Pro Gly  
65 70 75 80  
Asn Pro Gly Pro Ser Gly Ser Pro Gly Pro Lys Gly Gln Lys Gly Asp  
85 90 95  
Pro Gly Lys Ser Pro Asp Gly Asp Ser Ser Leu Ala Ala Ser Glu Arg  
100 105 110  
Lys Ala Leu Gln Thr Glu Met Ala Arg Ile Lys Lys Trp Leu Thr Phe  
115 120 125  
Ser Leu Gly Lys Gln Val Gly Asn Lys Phe Phe Leu Thr Asn Gly Glu  
130 135 140  
Ile Met Thr Phe Glu Lys Val Lys Ala Leu Cys Val Lys Phe Gln Ala  
145 150 155 160  
Ser Val Ala Thr Pro Arg Asn Ala Ala Glu Asn Gly Ala Ile Gln Asn  
165 170 175  
Leu Ile Lys Glu Glu Ala Phe Leu Gly Ile Thr Asp Glu Lys Thr Glu  
180 185 190  
Gly Gln Phe Val Asp Leu Thr Gly Asn Arg Leu Thr Tyr Thr Asn Trp  
195 200 205  
Asn Glu Gly Glu Pro Asn Asn Ala Gly Ser Asp Glu Asp Cys Val Leu  
210 215 220

18.

Leu Leu Lys Asn Gly Gln Trp Asn Asp Val Pro Cys Ser Thr Ser His

225

230

235

240

Leu Ala Val Cys Glu Phe Pro Ile

245

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/03311

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> Int.Cl <sup>6</sup> C07K14/47, C12N15/12, C12P21/02 // A61K39/00, A61K37/02 (C12P21/02, C12R1:91) According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl <sup>6</sup> C07K14/47, C12N15/12, C12P21/02 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US, 5270199, A (The Children's Medical Center Corporation), 14 December, 1993 (14. 12. 93) (Family: none)	1-11
X	Kedarnath Sastry et al., "The Human mannose-binding protein gene Exon Structure Reveals its Evolutionary Relationship to a Human Pulmonary Surfactant Gene and Localization to Chromosome 10" J. Exp. Med. (1989) Vol. 170, p.1175-1189	1-11
X	Maureen E. TAYLOR et al., "Structure and evolutionary origin of the gene encoding a human serum mannose-binding protein" Biochem. J. (1989) vol. 262 p.763-771	1-11
X	Hiroshi Kurata et al., "Structure and Function of Mannan-Binding Proteins Isolated from Human Liver and Serum" J. Biochem. (1994) vol. 115 p.1148-1154	1-11
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 20 October, 1998 (20. 10. 98)		Date of mailing of the international search report 4 November, 1998 (04. 11. 98)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/03311

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	R. ALAN et al., "A HUMAN MANNOSE-BINDING PROTEIN IS AN ACUTE-PHASE REACTANT THAT SHARES SEQUENCE HOMOLOGY WITH OTHER VERTEBRATE LECTINS" J. Exp. Med. (1988) vol. 167 p.1034-1046	1-11

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP98/03311

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>6</sup> C07K 14/47, C12N 15/12, C12P 21/02//A61K 39/00,  
A61K 37/02 (C12P 21/02, C12R 1:91)

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>6</sup> C07K 14/47, C12N 15/12, C12P 21/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)  
Genbank/EMBL/DBJ/GeneSeq, WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	US, 5270199, A(The Children's Medical Center Corporation) 14. 12月. 1993(14. 12. 93) (ファミリーなし)	1-11
X	Kedarnath Sastry et al. 「The Human mannose-binding protein gene Exon Structure Reveals its Evolutionary Relationship to a Human Pulmonary Surfactant Gene and Localization to Chromosome 10」 J. Exp. Med. (1989) Vol. 170 p. 1175-1189	1-11

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

20. 10. 98

国際調査報告の発送日

04.11.98

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

小暮 道明

4B

9637

電話番号 03-3581-1101 内線 3449

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Maureen E. TAYLOR et al. 「Structure and evolutionary origin of the gene encoding a human serum mannose-binding protein」 Biochem. J. (1989) vol. 262 p. 763-771	1-11
X	Hiroshi Kurata et al. 「Structure and Function of Mannan-Binding Proteins Isolated from Human Liver and Serum」 J. biochem. (1994) vol. 115 p. 1148-1154	1-11
X	R. ALAN et al. 「A HUMAN MANNOSE-BINDING PROTEIN IS AN ACUTE- PHASE REACTANT THAT SHARES SEQUENCE HOMOLOGY WITH OTHER VERTEBRATE LECTINS」 J. Exp. Med. (1988) vol. 167 p. 1034-1046	1-11

THIS PAGE BLANK (USPTO)



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (Cont)